

Ministerstvo školstva Slovenskej republiky
Vedecká rada Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov
Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre

Ing. Michal Rolinec

Postnatálna tvorba imunoglobulínov prasiat



Nitra 2009

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH ZDROJOV
Katedra veterinárskych disciplín

Postnatálna tvorba imunoglobulínov prasiat

Autoreferát dizertačnej práce
na získanie akademickej hodnosti philosophiae doctor
Vo študijnom programe: 6.1.3
Všeobecná živočíšna produkcia

Ing. Michal Rolinec

Nitra 2009

Dizertačná práca bola vypracovaná po absolvovaní dennej formy doktorandského štúdia na Katedre veterinárskych disciplín Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Doktorand: **Ing. Michal ROLINEC**

Katedra veterinárskych disciplín
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vedúci dizertačnej práce: **prof. MVDr. Pavel Šťastný, PhD.**

Katedra veterinárskych disciplín
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Oponenti: **prof. MVDr. Jaroslav Hajurka, PhD.**

Univerzita veterinárskeho lekárstva v Košiciach

prof. MVDr. Juraj Pivko, DrSc.

Centrum výskumu živočíšnej výroby v Nitre

prof. Ing. Alojz Kúbek, CSc.

Katedra genetiky a plemenárskej biológie, SPU v Nitre

Autoreferát bol zaslaný dňa 20.08.2009.

Stanovisko k dizertácii vypracovala Katedra veterinárskych disciplín FAPZ SPU v Nitre

Obhajoba dizertačnej práce sa koná dňa 25.09.2009 o 9:00 hod. pred komisiou pre obhajobu dizertačných prác študijného programu 6.1.3 Všeobecná živočíšna produkcia na Fakulte agrobiológie a potravinových zdrojov SPU v Nitre.

Miesto konania: Katedra genetiky a plemenárskej biológie
FAPZ, SPU v Nitre

Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Miestnosť: zasadacia miestnosť KGPB

S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na oddelení vedy a výskumu na dekanáte FAPZ SPU v Nitre.

Predseda komisie pre obhajoby v študijnom programe 6.1.3 Všeobecná živočíšna produkcia

prof. MVDr. Pavel Šťastný, PhD.

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

ABSTRAKT

Dizertačnú prácu sme realizovali na 10 prasničkách BU x L so živou hmotnosťou 160 – 210 kg a ich potomstve. 5 prasničiek bolo z chovu bez výskytu PRRS a 5 prasničiek bolo z chovu s výskytom PRRS. Sledovali sme obsah imunoglobulínov v sére prasničiek 7 dní pred predpokladaným pôrodom, v kolostre prasnic 12. hodín od začiatku pôrodu a obsah imunoglobulínov v sére prasiatok do 12. hodín od začiatku príjmu kolostra. Vzorky kolostra (10ml) sme odoberali v časových intervaloch: na začiatku pôrodu (0. hodina) a následne 3., 6. a 12. hodinu po odobratí prvej vzorky. Vzorky krvi (1 ml) sme odoberali v časových intervaloch: pred prijatím kolostra (0.hodina) a následne 3., 6. a 12. hodinu po začatí prijímania kolostra. V získaných vzorkách sme stanovovali obsah imunoglobulínov triedy IgG, IgA a IgM.

V obsahu imunoglobulínov v sére prasničiek sme stanovili signifikantne ($P < 0,01$) vyšší obsah IgG pri prasničkách z chovu bez výskytu PRRS ($11,09 \text{ mg.ml}^{-1}$). V obsahu imunoglobulínov v kolostre sme zistili signifikantne ($P < 0,01$) vyšší obsah v prospech chovu bez výskytu PRRS v obsahu IgG na začiatku pôrodu ($55,12 \text{ mg.ml}^{-1}$), tri hodiny od začiatku pôrodu ($48,89 \text{ mg.ml}^{-1}$), šesť hodín od začiatku pôrodu ($45,59 \text{ mg.ml}^{-1}$), a dvanásť hodín od začiatku pôrodu ($34,02 \text{ mg.ml}^{-1}$). Signifikantne ($P < 0,01$) vyššie hodnoty IgA sme v kolostre zaznamenali v chove bez výskytu PRRS na šiestu hodinu ($8,12 \text{ mg.ml}^{-1}$) a na dvanásť hodinu ($7,91 \text{ mg.ml}^{-1}$). Pri IgM sme v kolostre prasnic zaznamenali signifikantne ($P < 0,01$) vyšší obsah v chove bez výskytu PRRS a to na šiestu hodinu ($1,36 \text{ mg.ml}^{-1}$) a na dvanásť hodinu ($1,02 \text{ mg.ml}^{-1}$).

Stanovené koncentrácie Ig v sére prasiatok potvrdili kladnú závislosť obsahu Ig v kolostre a obsahu Ig v sére prasiatok. Všetky imunologické parametre v sére prasiatok od prasnic z chovu bez výskytu PRRS boli vyššie ako pri prasiatkach v chove s výskytom PRRS. Signifikantné ($P < 0,01$) rozdiely v prospech chovu bez PRRS sme zistili pri koncentrácii IgG v sére prasiatok na šiestu hodinu príjmu kolostra ($14,90 \text{ mg.ml}^{-1}$) a dvanásť hodinu príjmu kolostra ($22,37 \text{ mg.ml}^{-1}$). Pri koncentrácii IgA v sére prasiatok sme signifikantné ($P < 0,01$) rozdiely zaznamenali po tretej hodine príjmu kolostra ($1,8195 \text{ mg.ml}^{-1}$) a po dvanástich hodinách príjmu kolostra ($6,70 \text{ mg.ml}^{-1}$). Pri koncentrácii IgA v sére prasiatok na šiestu hodinu ($2,22 \text{ mg.ml}^{-1}$) bol prospech pre chov bez výskytu PRRS štatisticky preukazný iba na ($P < 0,05$). Pri koncentrácii IgM v sére prasiatok sme signifikantný rozdiel ($P < 0,01$) zaznamenali iba po dvanásťhodinovom príjme kolostra ($1,66 \text{ mg.ml}^{-1}$).

Zistili sme, že prasnice v chove s výskytom PRRS produkujú v kolostre nižšie hodnoty Ig, čoho dôsledkom sú aj nižšie hodnoty Ig stanovené v sére prasiatok od týchto prasnic.

Kľúčové slová: imunoglobulíny, kolostrum, sérum, imunita prasnice a prasiatok, PRRS

ABSTRACT

We realised the dissertation work on 10 sows BU x L with live weight 160-210 kg. From farm without presence of PRRS were 5 sows and other 5 sows were from farm with presence of PRRS. We detected content of immunoglobulins in sows serum 7 days before farrowing, sows colostrum 12 hours after beginning of farrowing and content of immunoglobulins in piglets serum to 12 hours from beginning of colostrum intake. Samples of colostrum (10 ml) we took in time intervals: at the beginning of farrowing (0. hour) and following 3., 6. and 12. hour after taking the first sample. Samples of blood (1 ml) we took in time intervals: before intake of colostrum (0. hour) and following 3., 6. and 12. hour after beginning of colostrum intake. In these samples we determined contents of immunoglobulins types IgG, IgA and IgM.

In content of immunoglobulins in sows serum we detected statistically significant ($P < 0,01$) higher content of IgG in sows from farm without presence of PRRS ($11,0887 \text{ mg.ml}^{-1}$). In content of immunoglobulins in colostrum we determined statistically significant ($P < 0,01$) higher contents of IgG at the beginning of farrowing ($55,1209 \text{ mg.ml}^{-1}$) in favour of farm without presence of PRRS, 3 hours from beginning of farrowing ($48,8784 \text{ mg.ml}^{-1}$), 6 hours ($45,5899 \text{ mg.ml}^{-1}$) and 12 hours ($34,0179 \text{ mg.ml}^{-1}$). Statistically significant ($P < 0,01$) higher content of IgA we detected in colostrum on farm without presence of PRRS at 6. hour ($8,1158 \text{ mg.ml}^{-1}$) and at 12. hour ($7,9138 \text{ mg.ml}^{-1}$). By IgM we determined in sows colostrum statistically significant ($P < 0,01$) higher content on farm without presence of PRRS and that was at 6. hour ($1,3638 \text{ mg.ml}^{-1}$) and at 12. hour ($1,0219 \text{ mg.ml}^{-1}$).

Detected concentrations of Ig in piglets serum confirmed positive relation of Ig content in piglets serum on Ig content in sows colostrum. All immunological parameters in piglets serum from sows coming from farms without presence of PRRS were higher as in those coming from farm with presence of PRRS. Statistically significant ($P < 0,01$) differences in favour of farm without presence of PRRS we determined in concentration of IgG in piglets serum at 6. hour of colostrum intake ($14,9007 \text{ mg.ml}^{-1}$) and at 12. hour of colostrum intake ($22,3679 \text{ mg.ml}^{-1}$). In concentration of IgA in piglets serum we detected statistically significant ($P < 0,01$) differences after 3. hour of colostrum intake ($1,8195 \text{ mg.ml}^{-1}$) and after 12. hour of colostrum intake ($6,6985 \text{ mg.ml}^{-1}$). Statistically significant only to $P < 0,05$ was concentration of IgA in piglets serum at 6. hour ($2,2184 \text{ mg.ml}^{-1}$) in favour

of farm without presence of PRRS. In the concentration of IgM in piglets serum was statistically significant difference ($P < 0,01$) only after 12. hour of colostrum intake ($1,6600 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).

We determined that sows on farm with presence of PRRS produce in colostrum lower contents of Ig what leads to lower contents of Ig in piglets serum from these sows.

Key words: immunoglobulins, colostrum, serum, immunity of sow and piglets, PRRS

POUŽITÉ OZNAČENIE

ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
HRP	horseradish peroxidase
IgA	imunoglobulín triedy A
IgG	imunoglobulín triedy G
IgM	imunoglobulín triedy M
mg	milligram
n	počet vzoriek
ng	nanogram
PRRS	reprodukčný a respiračný syndróm ošipaných
s	smerodajná odchýlka
TMB	tetrametyl benzidín
v	variálny koeficient
x	stredná hodnota
μl	mikroliter

OBSAH

1 Úvod.....	6
2 Cieľ práce.....	6
3 Materiál a metódy.....	7
4 Výsledky.....	11
5 Záver.....	15
6 Návrh na využitie výsledkov.....	18
7 Použitá literatúra	19
8 Publikované práce autora.....	21

1 ÚVOD

Zintenzívnenie výroby živočíšnych produktov v posledných dvoch desaťročiach je spojené s podstatným zvyšovaním počtu zvierat. S pomocou chovateľského pokroku sa vyvinuli také línie ošipaných, ktoré majú nielen vysoký potenciál úžitkovosti, ale aj vyššie nároky na biotické, abiotické a výživové faktory okolitého prostredia. Pokles úžitkovosti je často prvým príznakom pôsobiacich škodlivých faktorov, alebo vyvíjajúcich sa ochorení.

Vírus reprodukčného a respiračného syndrómu ošipaných (PRRS) je v súčasnosti uznávaný a obávaný patogén takmer vo všetkých krajinách s rozvinutým chovom ošipaných v Európe, Severnej Amerike a Ázii. Vakcinačné programy, ozdravovacie stratégie a nové diagnostické postupy sú hlavnou témou nielen vo vedeckej a odbornej literatúre, ale aj na medzinárodných konferenciách.

Sledovanie zdravia a úžitkovosti v chove, tak ako aj včasné rozpoznanie nerovnováhy má veľký význam. Hospodárske škody sa môžu znížiť iba včasným zákrokom a cieľným ošetrovaním zdravotných problémov. Predpoklad pre významnú ochranu zdravia a úžitkovosti v chove ošipaných je voľba vhodných parametrov, ako aj poznanie fyziologických pochodov respektíve referenčných hodnôt, ktoré možno ovplyvniť pomocou daných faktorov.

Pre sledovanie zdravotného stavu na základe imunologických parametrov prasníc je v súčasnosti nutný odber krvi. Pri ňom vypovedajú imunologické parametre o imunologickom statuse. Odber krvi je jednak nákladný a často spojený s veľkým stresom pre zviera. Pribeh odberu krvi je spojený so značným rizikom nielen pre odberateľa krvi, ale aj pre prasnicu.

Popri vedeckom záujme sledovať obsah protilátok prasiatok v prvých hodinách života ponúka stanovenie imunologických parametrov v kolostre prasníc možnú a menej drastickú metódu pre stanovenie zdravotného stavu prasníc.

2 CIEĽ PRÁCE

V predkladanej dizertačnej práci boli stanovené tieto ciele:

- Zistiť a porovnať koncentráciu imunoglobulínov tried (IgG, IgA, IgM) v sére prasníc pred pôrodom medzi chovom bez výskytu PRRS a chovom s výskytom PRRS.
- Zistiť a porovnať koncentráciu imunoglobulínov tried (IgG, IgA, IgM) v kolostre prasníc po pôrode medzi chovom bez výskytu PRRS a chovom s výskytom PRRS.

- Zistiť a porovnať koncentráciu imunoglobulínov tried (IgG, IgA, IgM) v sére prasiatok po narodení medzi chovom bez výskytu PRRS a chovom s výskytom PRRS.
- Sledovať dynamiku vývoja imunoglobulínov tried (IgG, IgA, IgM) v kolostre prasníc po pôrode.
- Sledovať dynamiku vývoja imunoglobulínov tried (IgG, IgA, IgM) v sére prasiatok po narodení.
- Zistiť závislosť medzi koncentráciou imunoglobulínov v sére prasníc pred pôrodom a koncentráciou imunoglobulínov v kolostre prasníc po pôrode.
- Zistiť závislosti medzi koncentráciou imunoglobulínov v kolostre prasníc a koncentráciou imunoglobulínov v sére prasiatok po narodení.
- Zistiť závislosť medzi koncentráciou imunoglobulínov v sére prasníc pred pôrodom a koncentráciou imunoglobulínov v sére prasiatok po narodení.

3 MATERIÁL A METÓDY

Zvieratá

Do experimentu bolo zaradených 5 prasničiek plemena BU, hmotnosť 160 - 210 kg z chovu prostého nákazlivých ochorení, označených ako skupina A. Zvieratá v tomto chove boli potvrdené veterinárnym ústavom ako negatívne na PRRS. Do skupiny B bolo zaradených 5 prasničiek plemena BU, hmotnosť 160 – 210 kg z chovu kde boli zvieratá potvrdené veterinárnym ústavom ako pozitívne na reprodukčný a respiračný syndróm ošipaných PRRS. Ošipané boli v rámci príparovacieho plánu inseminované.

Odber vzoriek krvi a kolostra

Vzorky krvi prasničiek určené na analýzu boli odobrané 7 dní pred predpokladaným pôrodom punkciou *vena cava cranialis*. Odber sa uskutočnil do sterilných skúmaviek v množstve 10,0 ml.

Po popôrodnom ošetrení sme prasiatkam odobrali prvú vzorku krvi (0 hodina) ešte pred prijatím kolostra (prekolostrálne obdobie). Prvú vzorku krvi sme prasiatkam odobrali punkciou *vena subcutanea abdominalis*. Ďalšie vzorky krvi sme prasiatkam odobrali v časových intervaloch 3., 6. a 12. hodinu po prvom prijatí kolostra. Odber sme uskutočnili do sterilných skúmaviek v množstve 1,0 ml.

Prvý odber vzoriek kolostra pre stanovenie imunoglobulínov sme robili po narodení prvých prasiatok (0 hodina) a ďalej v časových intervaloch 3., 6. a 12. hodinu po prvom odbere vzorky kolostra v množstve 10 ml ručným „oddojením“ do sterilných skúmaviek.

Spracovanie a uskladnenie vzoriek krvi

Vzorky krvi boli bezprostredne po odbere laboratórne spracované. Všetky vzorky boli odstredené pri 2500 – 3000 otáčkach/min po dobu 15 minút (Labofuge 300, Heraeus). Takto získané sérum sa zlialo do sterilných skúmaviek ependorf a po identifikácii sa uskladnilo pri teplote – 20°C v mraziacom boxe.

Spracovanie a uskladnenie vzoriek kolostra

Získané vzorky kolostra boli bezprostredne po odbere laboratórne spracované. Vzorky kolostra boli odstredené pri 2500 – 3000 otáčkach/min po dobu 15 minút (Labofuge 300, Heraeus). Odstredené kolostrum sa napipetovalo do sterilných skúmaviek ependorf a po označení sa uskladnilo pri teplote – 20°C v mraziacom boxe.

Vo vzorkách séra prasničiek, v kolostre prasnic a v sére prasiatok sme stanovovali imunoglobulíny tried IgG, IgA a IgM.

Stanovenie imunoglobulínov metódou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Princíp

Príslušný antigén sa naviaže na tuhú fázu, premyje sa a pridá sa zriedené sérum, v ktorom sa má určiť prítomnosť protilátok. Zmes sa nechá určitý čas inkubovať – prítomné protilátky reagujú s imobilizovaným antigénom. Po ďalšom premytí sa pridá enzýmom označená sekundárna protilátka a opäť sa premyje. Pridá sa enzýmový substrát a zmeria sa intenzita farebnej reakcie.

Materiál a pomôcky

- komponenty štartovacej sady ELISA pre kvantitatívne stanovenie jednotlivých tried prasačích Ig, č. E100-104-14 (Bethyl Laboratories, Inc.)
- primárna protilátka, kozí anti-prasačí IgG-afinitný, čistý, č. A100-104A-9
- naväzovací tlmivý roztok Carbonate-Bicarbonate, pH 9,6

- premývací roztok, 50mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05% Tween 20, pH 8,0
- blokovací („postcoat“) roztok, 50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% BSA, pH 8,0
- vzorka / konjugačné riedidlo, 50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% BSA, 0,05% Tween 20, pH 8,0
- štandardné prasačie sérum, č. RS10-107-3
- sekundárna protilátka, kozí anti-prasačí IgG-konjugovaný s HRP, č. A100-104P-17
- enzýmový substrát TMB, (H₂O₂)
- roztok pre zastavenie reakcie, 2 M H₂SO₄
- mikrotitračné platničky 96 jamkové
- mikropipety
- čítačka mikrotitračných platničiek (Model Σ 960 Metertech Inc.)

Postup

Všetky kroky sme uskutočnili pri laboratórnej teplote.

1. Naviazanie antigénu na stenu jamky

- Určili sme potrebné množstvo jamiek. Štandardy, vzorky a kontroly sme analyzovali dvojmo. Požadované množstvo mikrotitračných jamiek sme vložili do držiaka.
- Pre každú jamku, na ktorej povrch sme naväzovali antigén, sme zriedili 1 µl antigénu (A100-104A-9) v 100 µl naväzovacieho tlmivého roztoku.
- Platničky s naväzovaným antigénom sme inkubovali 60 minút.
- Po inkubácii sme z každej jamky odsali roztok s naväzovaným antigénom.
- Každú jamku sme premyli premývacím roztokom nasledovne:
 - a – každú jamku sme naplnili premývacím roztokom,
 - b – premývací roztok sme odstránili odsátím,
 - c – premytie sme zopakovali celkovo tri krát.

2. Blokovanie (nasýtenie ešte voľných väzobných miest)

- Do každej jamky sme pridali 200 µl blokovacieho „postcoat“ roztoku.
- Inkubovali sme 30 minút.
- Po inkubácii sme odstránili blokovací roztok a premyli sme všetky jamky presne tak ako v kroku 1.

3. Štandardy a vzorky

- Štandardy a vzorky sme riedili riedidlom podľa tabuľky č. 1.

Tabuľka č. 1

Krok	ng.ml ⁻¹	Kalibrátor RS 10-107-3	Zriedená vzorka
0	10 000	5 µl	8,25 ml
1	500	1 ml z kroku 0	19 ml
2	250	1 ml z kroku 1	1 ml
3	125	1 ml z kroku 2	1 ml
4	62,5	1 ml z kroku 3	1 ml
5	31,25	1 ml z kroku 4	1 ml
6	15,625	1 ml z kroku 5	1 ml
7	7,8	1 ml z kroku 6	1 ml

- Zriedenie vzoriek je založené na predpokladanej koncentrácii Ig vo vzorke a musí spadať medzi koncentračné rozpätie štandardov.
- 100 µl štandardu alebo vzorky sme preniesli do pridelených jamiek.
- Platničky sme inkubovali 60 minút.
- Po inkubácii sme vzorky a štandardy odsali a každú jamku sme premyli 5 – krát podobne ako v kroku č. 1.

4. HRP detekcia protilátok

- HRP konjugát sme zriedi v konjugačnom zried'ovadle.
- Preniesli sme 100 µl do každej jamky.
- Inkubovali sme 60 minút.
- Po inkubácii sme odsali HRP konjugát a každú jamku sme premyli 5 – krát podobne ako v kroku č. 1.

5. Reakcia enzým substrát

- Pripravili sme substrátový roztok (podľa odporúčania výrobcu).
- Použili sme TMB z komponentov štartovacej sady ELISA, zmiešali sme rovnaké množstvo z oboch substrátových reagentov.
- Do každej jamky sme preniesli 100 µl z roztoku substrátu.
- Platničky sme inkubovali 5 – 30 minút.
- Pre zastavenie TMB reakcie sme pridali do každej jamky 100 µl 2M H₂SO₄.
- Farebnú zmenu reakcie sme zmerali spektrofotomerom odčítaním pri stanovenej vlnovej dĺžke. Vlnová dĺžka pre substrát H₂O₂ je stanovená na 450 nm.

6. Výpočty a výsledky

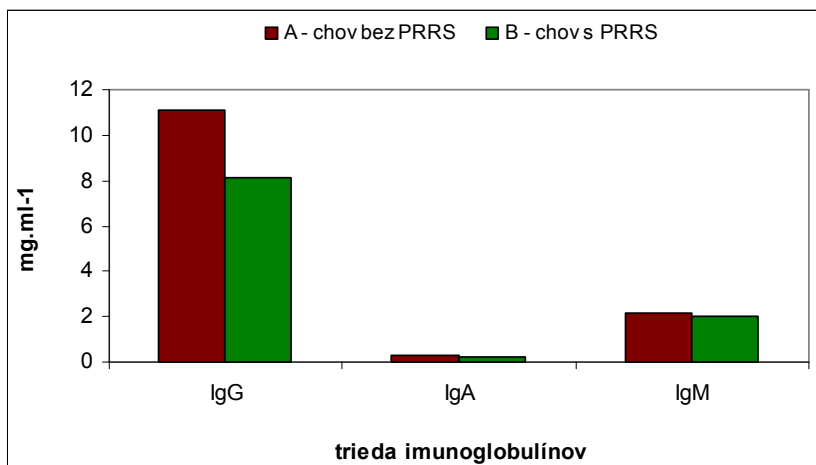
- Spriemerovali sa dve merania z každého štandardu, vzorky a kontroly.
- Štandardnú krivku sme vytvorili použitím počítačového softwaru, schopného generovať štvor parametrové logaritmy (4-PL) a pospájaním týchto bodov.

- Štandardnú krivku sme generovali pre každý set vzoriek.

Na štatistické vyhodnotenie získaných výsledkov sme použili jednofaktorovú analýzu rozptylu (ANOVA) programu Statgraphics. Priemerné hodnoty pre zistenie štatistickej preukaznosti sme vyhodnotili Duncanovým testom v programe Statgraphics. Na zistenie závislostí sme použili korelácie dostupné v programe Statgraphics.

4 VÝSLEDKY

Priebeh koncentrácie imunoglobulínov v sére prasničiek 7 dní pred očakávaným pôrodom

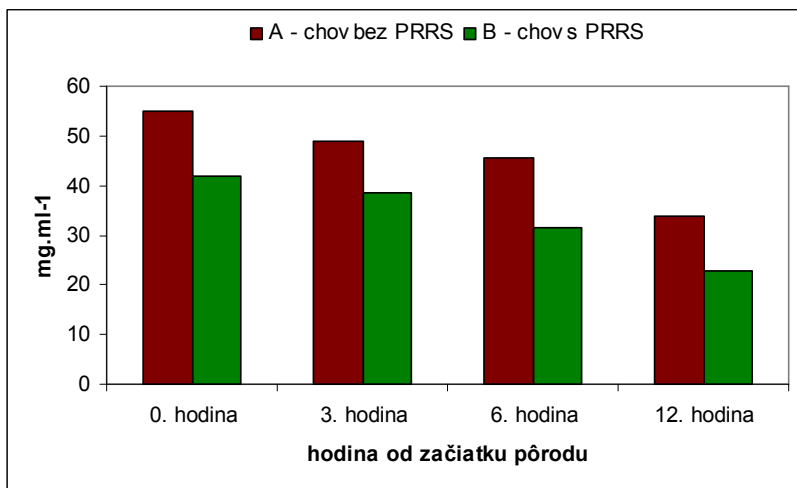


Graf č. 1. Koncentrácia jednotlivých tried imunoglobulínov v sére prasničiek 7 dní pred očakávaným pôrodom.

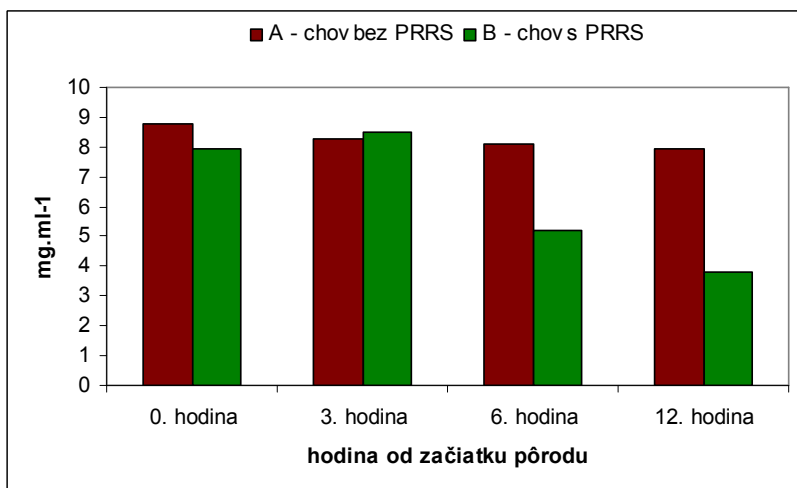
V grafe č. 1 vidieť koncentrácie imunoglobulínov v sére prasničiek pred očakávaným pôrodom. Najviac zastúpenou triedou je v oboch skupinách trieda IgG, ďalej nasleduje trieda IgM a najmenej zastúpenou triedou je trieda IgA

Priebeh koncentrácie imunoglobulínov v kolostre prasnic

V grafe č. 2 vidieť v oboch skupinách postupný pokles koncentrácie IgG. Rozdiel v koncentrácii IgG sa pohyboval medzi 10 až 14 mg.ml⁻¹. Dá sa povedať, že kolostrum od prasnic v skupine B neposkytuje tak kvalitnú pasívnu imunizáciu, ako kolostrum od prasnic v skupine A.



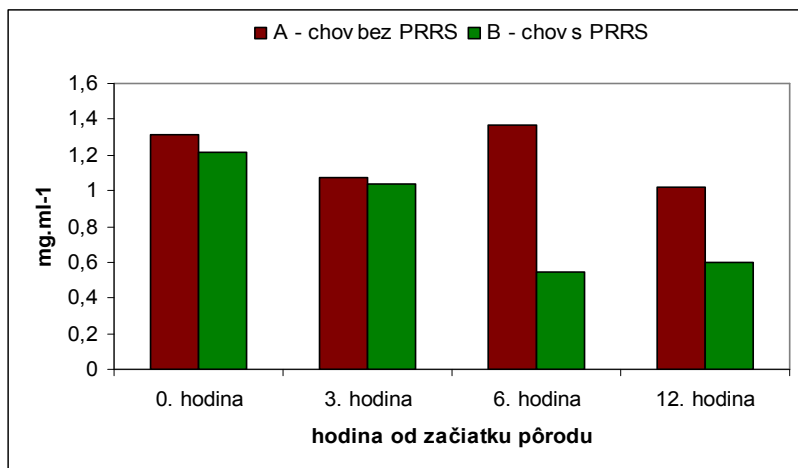
Graf č. 2. Priebeh koncentrácie IgG v kolostre prasníc v mg.ml⁻¹.



Graf č. 3. Priebeh koncentrácie IgA v kolostre prasníc v mg.ml⁻¹.

V koncentrácii IgA v kolostre prasníc je vidieť dve rozličné krivky (graf č. 3). V skupine A si IgA udržiava takmer nezmenenú koncentráciu počas prvých dvanástich hodín od začiatku pôrodu, čo dáva IgA veľmi dobrý predpoklad na to, že sa má stať v mlieku dominujúcim imunoglobulínom. Predpokladáme, že IgA bude mať v mlieku prasníc vyššiu koncentráciu a teda aj vyššie % z celkových imunoglobulínov

a v konečnom dôsledku by malo poskytnúť lepšiu ochranu tráviaceho traktu cicajúcim prasiatkam. Koncentrácia IgA v kolostre od prasníc zo skupiny B začala klesať vo veľmi skorom období. Stanovená koncentrácia v dvanástej hodine na úrovni $4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ je veľmi nízka. Pokles koncentrácie IgA na približne $4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ sa pri prasniciach vyskytuje až okolo siedmeho dňa laktácie

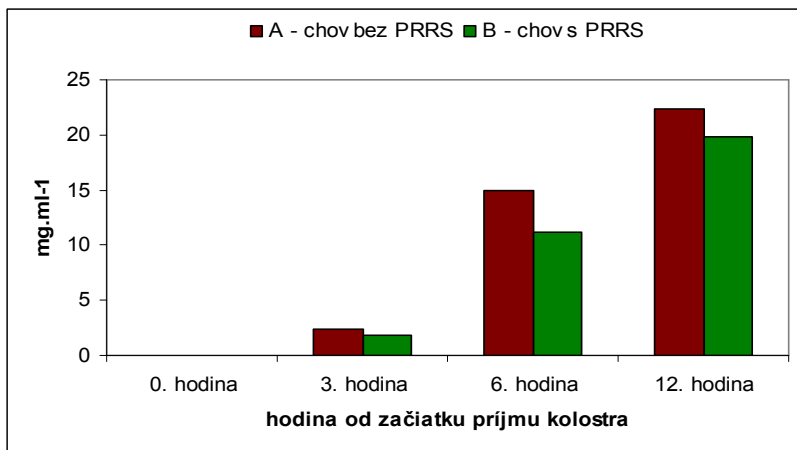


Graf č. 4. *Priebeh koncentrácie IgM v kolostre prasníc v $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.*

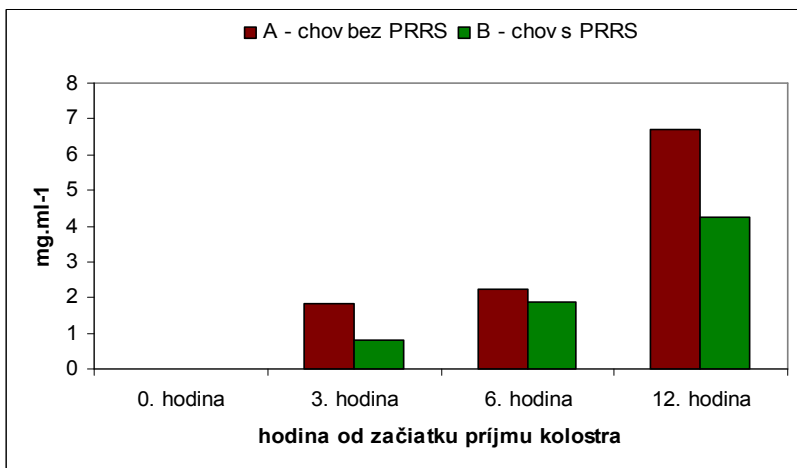
Pri IgM sme v oboch skupinách zaznamenali rovnaký vývoj koncentrácie do tretej hodiny. Potom nasledoval v kolostre od prasníc v skupine A mierny vzostup v koncentrácii v šiestej hodine a následne pokles a priblíženie sa k priemeru. V kolostre od prasníc zo skupiny B nasledoval po tretej hodine výrazný pokles v koncentrácii IgM ale následne po dvanástu hodinu mierny vzostup jeho koncentrácie, čo by nasvedčovalo jeho zvýšeniu percentuálneho obsahu v mlieku až na 4 %.

Priebeh koncentrácie imunoglobulínov v sére prasiatok

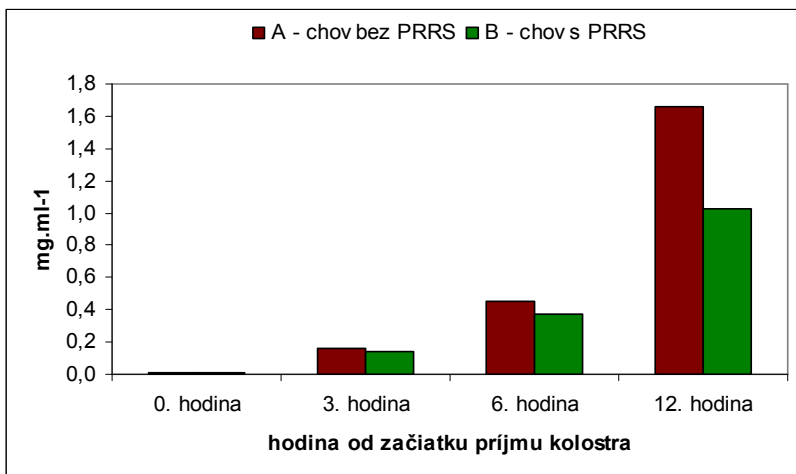
V grafoch č. 5, 6 a 7 sú znázornené vzostupy koncentrácií imunoglobulínov jednotlivých tried v sére prasiatok s postupujúcim časom. Vo všetkých troch triedach, ako aj v oboch skupinách sme zaznamenali postupný nárast v koncentrácii imunoglobulínov v sére prasiatok. Hladiny celkových imunoglobulínov vystúpili v skupine A na hodnotu $30 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a v skupine B na hodnotu $25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Nižšiu hodnotu pri prasiatkach v skupine B si vysvetľujeme príjmom kolostra s nižšou koncentráciou imunoglobulínov.



Graf č. 5. *Priebeh koncentrácie IgG v sére prasiatok od narodenia.*



Graf č. 6. *Priebeh koncentrácie IgA v sére prasiatok od narodenia.*



Graf č. 7. *Priebeh koncentrácie IgM v sére prasiatok od narodenia*

5 ZÁVER

V práci sme sledovali dynamiku vývoja imunoglobulínov tried (IgG, IgA, IgM) v krvnom sére prasničiek 7. dní pred pôrodom, v kolostru prasnic 12 hodín po začiatku pôrodu a v sére prasiatok pred prijatím kolostra a 12 hodín po prvom prijatí kolostra. Zistili sme:

Priemerný obsah celkových imunoglobulínov v sére prasničiek pred pôrodom bol 11,95 mg.ml⁻¹, pričom prasničky z chovu bez výskytu PRRS mali signifikantne vyšší obsah imunoglobulínov v sére ako prasnice z chovu s výskytom PRRS.

Najviac zastúpenou triedou imunoglobulínov v sére prasničiek pred pôrodom bola v oboch skupinách trieda IgG, potom nasledovala trieda IgM a najmenej zastúpená bola trieda IgA.

V oboidvoch skupinách bola hladina celkových imunoglobulínov na dolnej hranici fyziologickej normy.

Priemerný obsah imunoglobulínov v kolostru prasnic na začiatku pôrodu bol 58,19 mg.ml⁻¹. Prasnice z chovu bez výskytu PRRS mali vyšší obsah imunoglobulínov v kolostru ako prasnice z chovu s výskytom PRRS. Signifikantné rozdiely v obsahu imunoglobulínov v kolostru sme medzi chovmi na začiatku pôrodu zistili pri triede IgG.

Najviac zastúpenou triedou imunoglobulínov v kolostru prasnic v oboidvoch chovoch na začiatku pôrodu bola trieda IgG, potom IgA a najmenej zastúpená bola trieda IgM.

Priemerný obsah imunoglobulínov v kolostru prasnic tri hodiny po začiatku pôrodu bol 53,08 mg.ml⁻¹. Prasnice z chovu bez výskytu PRRS

mali vyšší obsah imunoglobulínov v trojhodinovom kolostru ako prasnice z chovu s výskytom PRRS. Signifikantné rozdiely medzi chovmi sme v obsahu imunoglobulínov v trojhodinovom kolostru zistili pri triede IgG.

Najviac zastúpenou triedou imunoglobulínov v trojhodinovom kolostru prasníc v oboch chovoch bola trieda IgG, potom IgA a najmenej zastúpená bola trieda IgM.

Priemerný obsah imunoglobulínov v kolostru prasníc šesť hodín po začiatku pôrodu bol $46,13 \text{ mg.ml}^{-1}$. Prasnice z chovu bez výskytu PRRS mali vyšší obsah imunoglobulínov v šesťhodinovom kolostru ako prasnice z chovu s výskytom PRRS. Signifikantné rozdiely medzi chovmi sme v obsahu imunoglobulínov v šesťhodinovom kolostru zistili pri triede IgG, IgA, IgM.

Najviac zastúpenou triedou imunoglobulínov v šesťhodinovom kolostru prasníc v oboch chovoch bola trieda IgG, potom IgA a najmenej zastúpená bola trieda IgM.

Priemerný obsah imunoglobulínov v kolostru prasníc dvanásť hodín po začiatku pôrodu bol $35,10 \text{ mg.ml}^{-1}$. Prasnice z chovu bez výskytu PRRS mali vyšší obsah imunoglobulínov v dvanásťhodinovom kolostru ako prasnice z chovu s výskytom PRRS. Signifikantné rozdiely medzi chovmi sme v dvanásťhodinovom kolostru zistili pri triede IgG, IgA, IgM.

Najviac zastúpenou triedou imunoglobulínov v dvanásťhodinovom kolostru prasníc v oboch chovoch bola trieda IgG, potom IgA a najmenej zastúpená bola trieda IgM.

Potvrdila sa kladná závislosť obsahu imunoglobulínov v sére prasníc k obsahu imunoglobulínov v kolostru prasníc. Obsah imunoglobulínov v kolostru prasníc počas prvých dvanásť hodín od začiatku pôrodu bol na dolnej hranici fyziologickej normy. Hodnoty imunoglobulínov v kolostru prasníc s postupujúcim časom klesali v oboch chovoch.

Priemerný obsah imunoglobulínov v sére prasiatok pred prijatím kolostra bol $0,08 \text{ mg.ml}^{-1}$. Prasiatka z chovu bez výskytu PRRS mali vyšší obsah imunoglobulínov v sére pred prijatím kolostra ako prasiatka z chovu s výskytom PRRS. Signifikantné rozdiely v obsahu imunoglobulínov v sére prasiatok pred prijatím kolostra sme medzi chovmi nezaznamenali. Toto potvrdzuje prenatálnu tvorbu imunoglobulínov pri prasiatkach.

Najviac zastúpeným imunoglobulínom v sére prasiatok, ktoré ešte neprijali kolostrum v oboch chovoch bol IgG, potom nasledoval IgA a najmenej zastúpeným imunoglobulínom bol IgM.

Priemerný obsah imunoglobulínov v sére prasiatok tri hodiny po prvom prijímaní kolostra bol $3,57 \text{ mg.ml}^{-1}$. Prasiatka z chovu bez výskytu PRRS mali vyšší obsah imunoglobulínov v sére po trojhodinovom prijímaní kolostra ako prasiatka z chovu s výskytom PRRS. Signifikantné rozdiely

v obsahu imunoglobulínov v sére prasiatok po trojhodinovom príjme kolostra sme medzi chovmi zaznamenali pri triede IgA.

Najviac zastúpeným imunoglobulínom v sére prasiatok, ktoré prijímali kolostrum tri hodiny v oboch chovoch bol IgG, potom nasledoval IgA a najmenej zastúpeným imunoglobulínom bol IgM.

Priemerný obsah imunoglobulínov v sére prasiatok šesť hodín po prvom príjme kolostra bol 15,52 mg.ml⁻¹. Prasiatka z chovu bez výskytu PRRS mali vyšší obsah imunoglobulínov v sére po šesťhodinovom príjme kolostra ako prasiatka z chovu s výskytom PRRS. Signifikantné rozdiely v obsahu imunoglobulínov v sére prasiatok po šesťhodinovom príjme kolostra sme medzi chovmi zaznamenali pri triede IgG a IgA.

Najviac zastúpeným imunoglobulínom v sére prasiatok, ktoré prijímali kolostrum šesť hodín v oboch chovoch bol IgG, potom nasledoval IgA a najmenej zastúpeným imunoglobulínom bol IgM.

Priemerný obsah imunoglobulínov v sére prasiatok dvanásť hodín po prvom príjme kolostra bol 27,93 mg.ml⁻¹. Prasiatka z chovu bez výskytu PRRS mali vyšší obsah imunoglobulínov v sére po dvanásťhodinovom príjme kolostra ako prasiatka z chovu s výskytom PRRS. Signifikantné rozdiely v obsahu imunoglobulínov v sére prasiatok po dvanásťhodinovom príjme kolostra sme medzi chovmi zaznamenali pri triedach IgG, IgA a IgM.

Najviac zastúpeným imunoglobulínom v sére prasiatok, ktoré prijímali kolostrum dvanásť hodín v oboch chovoch bol IgG, potom nasledoval IgA a najmenej zastúpeným imunoglobulínom bol IgM.

Potvrdil sa predpoklad, že prasiatka z chovu s výskytom PRRS budú mať nižšiu hladinu imunoglobulínov, ako prasiatka z chovu bez výskytu PRRS.

Pri dynamike vývoja koncentrácie imunoglobulínov v kolostre prasníc od začiatku pôrodu s postupujúcim časom klesala koncentrácia imunoglobulínov. Najväčší pokles sme zaznamenali pri IgG a najnižší pokles pri IgA, ktorého koncentrácia sa počas prvých dvanástich hodín od začiatku pôrodu zmenšila iba minimálne.

Pri dynamike vývoja koncentrácie imunoglobulínov v sére prasiatok sme s postupujúcim časom zaznamenali stúpajúcu tendenciu. Najväčší percentuálny nárast sme zaznamenali v prvých troch hodinách príjmu kolostra a najväčšie množstvo sa resorbovalo od tretej po dvanásťu hodinu príjmu kolostra.

Zisťované závislosti medzi obsahom imunoglobulínov v sére prasníc pred pôrodom a obsahom imunoglobulínov v kolostre prasníc, ako aj závislosti medzi obsahom imunoglobulínov v kolostre a obsahom imunoglobulínov v sére prasiatok a závislosti medzi obsahom imunoglobulínov v sére prasiatok pred pôrodom a obsahom imunoglobulínov v sére prasiatok boli kladné.

6 NÁVRH NA VYUŽITIE VÝSLEDKOV

Posudzovanie imunologického vybavenia prasiatok je dôležitý činiteľ pre chovateľskú prax. Pri prasiatkach je hladina imunoglobulínov v kolostre prasníc jedným z perspektívnych parametrov pre hodnotenie stavu odolnosti prasiatok voči exogénnym vplyvom v prvých dňoch života.

Z hľadiska využitia zistených hladín imunoglobulínov v praxi je potrebné zamerať sa na hlbšie štúdium tejto problematiky.

Využitie výsledkov v zootechnickej praxi

- Počas a po pôrode sledovať mliekovosť prasníc a prasnice s nízkou mliekovosťou vyradovať z chovu.
- Keďže sa prasiatka rodia takmer bez imunoglobulínov je treba zabezpečiť počas pôrodu a do doby odstavu nadštandardné zoohygienické prostredie.
- Z hľadiska vývoja pasívnej imunity a v konečnom dôsledku vývoja chránenosti voči chorobám odporúčame robiť odhad hladiny imunoglobulínov v sére prasiatok na základe stanovenia imunoglobulínov v kolostre prasníc.
- Využívať stanovenie imunoglobulínov v kolostre prasníc na určenie imunologického stavu prasníc.
- Z hľadiska odolnosti prasiatok voči vonkajším vplyvom je potrebné posudzovať hladiny jednotlivých tried imunoglobulínov.
- V chovoch s výskytom PRRS je potrebné tento vírus eliminovať.

Odporúčania a prínosy pre rozvoj vedného odboru

- Za prínos možno považovať podrobné zmapovanie imunologického zloženia kolostra a séra prasiatok v prvých 12. hodinách.
- Prínosom pre vedný odbor je možné považovať aj tú skutočnosť, že sa štúdium imunoglobulínov v takomto časovom rozhraní doteraz u nás nevykonalo. Prácu možno považovať za začiatok, na ktorom je možné budovať ďalší experimentálny vývoj.
- Študovať závislosti v obsahu imunoglobulínov medzi prasnica, kolostrom a sérom prasiatka na početnejších a homogénnejších skupinách a odvodiť signifikantnejšie regresné rovnice.
- Objasniť faktory vplývajúce na prestup imunoglobulínov bariérami mliečnej žľazy. Využitie týchto výsledkov pri selekcii a spôsoboch ovplyvnenia mechanizmu prestupu imunoglobulínov bariérami mliečnej žľazy.

- Preskúmať mechanizmus prestupu imunoglobulínov v tenkom čreve mláďat a spôsoby ovplyvnenia čriev pre zefektívnenie resorpcie a času resorpcie imunoglobulínov.
- Zisťovať aký je zdravotný stav zvierat v neskoršom období v závislosti od imunologickej výbavy v prvých hodinách života.

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

1. **Allen, W. D. – Porter, P.** 1977. The relative frequencies and distribution of immunoglobulin-bearing cells in the intestinal mucosa of neonatal and weaned pigs and their significance in the development of secretory immunity. In *Immunology*, 1977, č. 32, s. 819-824.
2. **Bontempo, V. – Sciannimanico, D. – Pastorelli, G. – Rossi, R. – Rosi, F. – Corino, C.** 2004. Dietara conjugated linoleic acid positively affects immunologic variables in lactating sows and piglets. In *Nutr. Immunol.*, 2004, č.134, s. 817-824.
3. **Farmer, C.- Charagu, P. – Palin, M. F.** 2007. Influence of genotype on metabolic variables, colostrum and milk composition of primiparous sows. In *Can. J. Anim. Sci.*, 2007, č. 87, s.511-515.
4. **Feng, J. - Ma, W. Q. - Xu, Z. R. - Wang, Y. Z. – Liu, J. X.** 2007. Effects of iron glycine chelate on growth, haematological and immunological characteristics in weanling pigs. In *Animal Feed Science and Technology*, Volume 134, 2007, Issues 3-4, s. 261-272.
5. **Ferenčík, M. – Rovenský, J. – Nyulassy, Š.** 1999. Imunológia základné termíny a definície, Slovak academic press, Bratislava, 1999, 283 s., ISBN 80-88908-38-8
6. **Fleischer, L.-G. – Gerber, G. – Gremmels, H.-D. – Lippert, E. – Westphal, G.** 2003. Acute phase proteins in lactating sows and piglet growth: dependence on age and immunostimulation. In: *Fourth European Colloquium on Acute Phase Proteins*, Segovia, Spain, 2003
7. **Foisnet, A., - Farmer, C. - Etienne, M. - Le Dividich, J. - Quesnel, H.** 2008. Endocrine regulation of colostrum production in primiparous sows. In *Proc. Joint ADSA-ASAS Annual Meeting, and 8th International Workshop on the Biology of Lactation in Farm Animal*, July 7-11, Indianapolis. 2008. s.168.
8. **Habe, F.** 1974. Die quantitativen Veränderungen der Immunoglobuline in Blutserum der Ferkel bei verschiedenen Aufzuchtverfahren. Diss. Gießen, Univ. Fachber. Angewandte Genetik, 1974
9. **Hammerberg, C. – Schurig, G. G. – Ochs, D. L.** 1989. Immunodeficiency in young pigs. In *Am. J. Vet. Res.* 1989, č. 50, s. 868-874.

10. **Harmsen, M. M. - Fijten, H. P. D. - Dekker, A. – Eblé, P. L.** 2008. Passive immunization of pigs with bispecific llama single-domain antibody fragments against foot-and-mouth disease and porcine immunoglobulin. In *Veterinary Microbiology*, Volume 132, 2008, Issues 1-2, s. 56-64.
11. **Heo, S. - Yang, Y. X. - Jin, Z. - Park, M. S. - Yang, B. K. – Chae, B. J.** 2008. Effects of dietary energy and lysine intake during late gestation and lactation on blood metabolites, hormones, milk composition and reproductive performance in primiparous sows. In *Can. J. Anim. Sci.*, 2008, č. 88, s. 247-255.
12. **Jensen, P. T. – Pedersen, K. B.** 1979. Studies on immunoglobulins and trypsin inhibitor in colostrum and milk from sows and in serum of their pigs. In *Acta vet. Scand.*, 1979, č. 20, s. 60-72.
13. **Kaltreider, H. B. – Johnsson, J. S.** 1972. Porcine immunoglobulins. 1.: Identification of classes and preparation of specific antisera, In *Immunol.* 1972, č. 109, s. 992-998.
14. **Klobasa, F.** 1988. Immunologische untersuchungen im Rahmen der Ferkelaufzucht. In *Vortragsskript anlässlich einer sitzung des Arbeitskreises Tiergarten für Schweinegesundheit und Schweineproduktion*, April 1988.
15. **Klobasa, F. – Habe, E. - Werhahn, E.** 1991b. Untersuchungen über Absorption der kolostralen Immunglobuline bei neugeborenen Ferkeln. II. Mitteilung: Einfluss der Verabreichungsdauer der Kolostralmilch. In *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 1991, č. 104, s. 223-227.
16. **Lukáč, N.** 2000. Determinácia stavu pasívnej humorálnej imunity teliat v peripartálnom období. dizertačná práca, Nitra: SPU, 2000. 84 s.
17. **Podmanický, D. – Podmanická, T. – Šťastný, P. – Lacková, D. – Turoň, L. – Podmajerský, S.** 1998. Reprodukčný a respiračný syndróm ošípaných, In: *Medzinárodná konferencia o reprodukcii hospodárskych zvierat*, Zborník, 1998, s. 39-40.
18. **Rooke, J. A. – Bland, I. M.** 2002. The acquisition of the passive immunity in the new-born piglet. In *Livestock Production Science* 2002, č. 78, s. 13-23.
19. **Soto, F. R. M. - Pinheiro, S. R. - Ito, F. H. - Moraes, Z. M. - Gonçalves, A. P. - Bernardi, F.** 2008. Evaluation of colostrum immunity in swine with commercial anti-leptospira polyvalent whole-bacteria vaccine. In *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Volume 31, 2008, Issue 4, s. 327-335.
20. **Zou, S. – McLaren, D. G. – Hurley, W. L.** 1992. Pig colostrum and milk composition: comparison between Chinese Meishan and US breeds. In: *Livest. Prod. Sci.* 1992, č. 30, s. 115-127.

8 PUBLIKOVANÉ PRÁCE AUTORA

ROLINEC, M. – ŠŤASTNÝ, P. – KANKA, T. – KÚBEK, A. – ŠŤASTNÁ, D. 2008. The effect of oxytocin applied at farrowing sows on content of colostrum fatt. In *Biotechnology 2008*. České Budějovice: University of South Bohemia, 2008, s. 451-453.

ČANAKYOVÁ, Z. – SLOBODOVÁ, Z. – **ROLINEC, M.** – KANKA, T. 2008. Post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs. In: *X. Konference mladých vědeckých pracovníků*. Brno: University of veterinary and pharmaceutical sciences, 2008, s. 64 -66.

ROLINEC, M. – KANKA, T. – ČANAKYOVÁ, Z. – SLOBODOVÁ, Z. 2008. Oxytocin – the birth of sows – the quality of colostrum. In : *X. Konference mladých vědeckých pracovníků*. Brno: University of veterinary and pharmaceutical sciences, 2008, s. 67 -69.

ROLINEC, M. – ŠŤASTNÝ, P. – KANKA, T. 2008. Influence of nutrition on health of neonatal pigs. In: *Days of animal nutrition*. Nitra: Slovak university of agriculture, 2008, s. 190-193.

ROLINEC, M. – MINDEK, S. – KANKA, T. – ČANAKYOVÁ, Z. – DANKOVÁ, Z. – SCHUBERTOVIÁ, Z. 2009. Effect of farrowing fortification on the content of proteins in sows colostrum. In *XI. Konference mladých vědeckých pracovníků*. Brno: University of veterinary and pharmaceutical sciences, 2009, s. 72-74.

ČANAKYOVÁ, Z. – DANKOVÁ, Z. – **ROLINEC, M.** – KANKA, T. – MINDEK, S. – RIECKÁ, Z. 2009. PMWS situation in Slovak Republic and worldwide. In *XI. Konference mladých vědeckých pracovníků*. Brno: University of veterinary and pharmaceutical sciences, 2009, s. 81-83.

DANKOVÁ, Z. – ČANAKYOVÁ, Z.– **ROLINEC, M.** – KANKA, T. – MINDEK, S. 2009. Postnatal transmission of colostrum lipids, lactose and total protein through enterocytes of the small intestine of piglets. In *XI. Konference mladých vědeckých pracovníků*. Brno: University of veterinary and pharmaceutical sciences, 2009, s. 84-86.

KANKA, T. – **ROLINEC, M.** – DANKOVÁ, Z. – ČANAKYOVÁ, Z. 2009. Content of immunoglobulins in sow colostrum and in intestine of neonatal piglets. In *XI. Konference mladých vědeckých pracovníků*. Brno: University of veterinary and pharmaceutical sciences, 2009, s. 87-89.