

Nová detekce živočišných proteinů

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský plní v rámci své gesce pro krmiva nejen funkci kontrolního a zkušebního orgánu, ale rovněž informuje odbornou veřejnost o nových předpisech a nařízeních. Současně má pomáhat při orientaci v současné legislativě a v jejím uplatňování v praxi. Oblastí, kde se nedávno výrazně změnila legislativa, je opět povolení zkrmovat masokostní moučku farmovým zvířatům.

Národní referenční laboratoř pro detekci živočišných proteinů (NRL-ŽP) je jedním z nástrojů kontroly přítomnosti zakázaných živočišných proteinů v krmivech. Současně plní i dal-

operačním postupem EURL-AP, ale nastavila si i limit detekce na úrovni 0,01 %. Zavedení primerů pro detekci DNA prasete laboratoř ověřila účasti v implementačním testu EURL-AP.

40 kopií DNA, což odpovídá 0,125% kontaminace krmiva. Z křivek přístroje na RT-PCR metodu, kterým je LightCycler 2.0 firmy ROCHE, byl odvozený limit detekce, který odpovídá

sledkem, který NRL-ŽP potěšil. V testu se Národní referenční laboratoř stoprocentně shoduje s výsledkem požadovaným EURL-AP. Těto shody bylo dosaženo díky špičkovému vyba-

který ji provádí, nemůže rozlišit přítomnost uvedených komponent do jednotlivých druhů zvířat. Mikroskopicky lze neomylně rozlišit rybí kosti (obr. 1) i další komponenty, například žábry (obr. 2) a šupiny (obr. 3). Také lze spolehlivě rozlišit tkáň některých suchozemských živočichů, konkrétně kosti ptáků – drůbeže (obr. 4) a kosti savců (obr. 5).

Naproti tomu u měkkých tkání, jako jsou svaly, mikroskopická metoda neumožňuje určit původ. Zde musí vždy následovat druhá referenční metoda, RT-PCR, jejíž pomocí lze na základě přítomnosti DNA v krmivu určit původ kontaminace až do druhů.

Mikroskopická metoda je levnější z hlediska finančních nákladů, zejména ceny potřebných chemikálií, a také náročnosti na přípravu vzorků k rozboru. Na druhé straně vycvičit specialistu-analytika pro mikroskopickou metodu vyžaduje zcela mimořádné nároky, požadovaná je zejména jeho preciznost, vytrvalost a schopnost orientovat se na detail. Úplná samostatnost specialisty-analytika vyžaduje minimálně roční výcvik a následně samostatný trénink, ve kterém prokáže schopnost zachytit živočišnou tkáň na úrovni jedné desetin procenta z původní kontaminace krmiva.

RT-PCR je proti mikroskopické metodě výrazně selektivnější. Principem metody je detekce specifické DNA jednotlivých druhů, a právě proto ji v drtivé většině případů musí předcházet metoda mikroskopická, která umožní vyslovit teorii, čím může být vzorek kontaminován, a teprve následně se metoda RT-PCR zaměří na druh zvířete nebo skupiny zvířat, jako jsou například přežvýkavci. RT-PCR je schopna detekce pří-

tomnosti specifické DNA při kontaminaci na hranici desetin procenta.

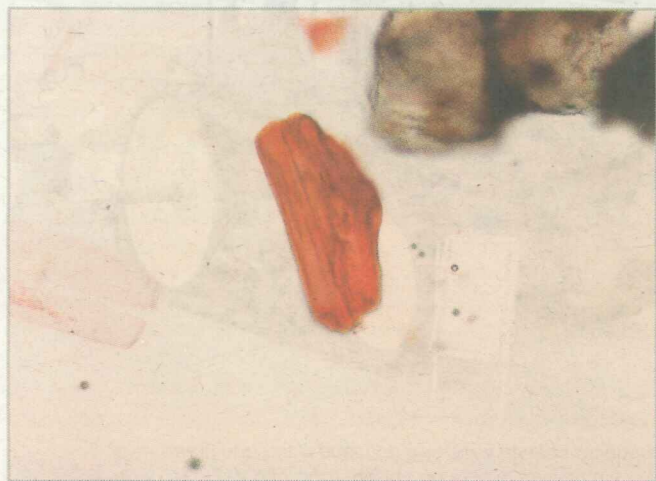
Proti metodě mikroskopické jde o výrazně dražší stanovení. Náklady na vstupní chemikálie a údržbu laboratoře převyšují trojnásobně náklady na mikroskopickou metodu. Umožňuje však dokončení rozborů krmiv. Laboratoř může vyslovit závěr, zahrnující původ kontaminace, a to až do druhové specifikace zvířat, ze kterých byla masokostní moučka přítomná v krmivu připravena.

Hodnocení laboratoře

Laboratoř je schopna velmi flexibilně reagovat na požadavky a trendy vycházející z úrovně evropské referenční laboratoře EURL-AP. Rychlost zavedení metody poukazuje na dobrou připravenost týmu. Zároveň je v rámci úspěšnosti v testech EURL-AP laboratoř hodnocena jako jedna ze tří nejlepších z celé Evropské unie. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v rámci své působnosti může za určitých podmínek provádět výjma rozborů vzorků odebraných v rámci úředních kontrol i rozbor vzorků a detekci živočišných proteinů v krmivech soukromým subjektům. Laboratoř může v současnosti plnit v této oblasti i funkci poradenskou, a to jak vědeckým, tak odborným subjektům.

Michaela Růžková
Jana Fikarová
Olga Koutná
Iva Navrátilová

Ústřední kontrolní a zkušební
ústav zemědělský
Lubomír Růžek
Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních
zdrojů
Česká zemědělská univerzita
v Praze



Obr. 1 – Rybí kosti při 400násobném zvětšení (vlevo) a 200násobném zvětšení



Foto Michaela Růžková

ší funkci, je poradním orgánem pro evropskou referenční laboratoř (EURL-AP). Aktivně se účastní při přípravě standardních operačních postupů, které jsou pak závazné v celé Evropské unii.

Laboratoř má zavedeny dvě referenční metody k detekci živočišných komponent. Metodu

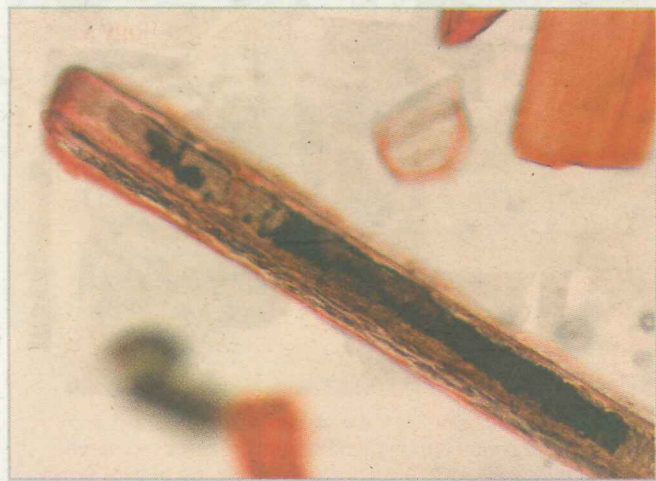
Zavedení nové detekce v laboratoři

Laboratoř obdržela v říjnu 2015 instrukce pro vypracování nového postupu detekce. Následně byla upozorněna na změny v oblasti chemikálií a nakonec byla přezkoušena ze schopnosti detekovat pomocí nových chemikálií

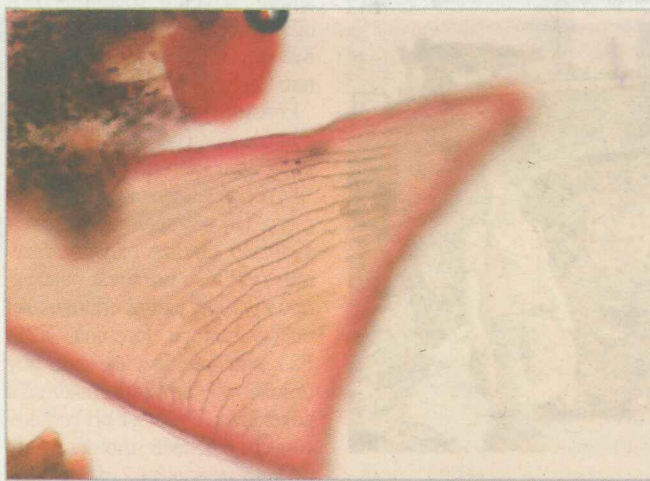
37,29 cyklu s tím, že kalibrační roztoky reagovaly ve 32. až 34. cyklu a kalibrační křivka nevykazovala žádnou odchylku. Z toho vyplývá, že laboratoř pracuje svědomitě a precizně.

Limit detekce byl tedy stanoven na hodnotě 37,29 cyklu a vzorky, které měly nepatrnou reakci s činidly od 37,30 cyklu

vení laboratoře, ale také díky zkušenému personálnímu obsazení. Na základě vývoje a aktivní účasti NRL-ŽP lze konstatovat, že laboratoř je schopna dostát svým závazkům a v současné době rutinně provádět již detekci DNA prasete v souladu s EURL-AP. Stále je však nutné mít na paměti, že RT-PCR je do-



Obr. 2 – Žábry při 200násobném zvětšení Foto Michaela Růžková



Obr. 3 – Šupina při 200násobném zvětšení Foto Michaela Růžková

starší, ve své podstatě unikátní (a zatím nenahraditelnou), mikroskopickou detekci živočišných tkání a moderní metodu polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR). V současné době se laboratoř dále zdokonalila v oblasti detekce živočišných proteinů pomocí metody RT-PCR zavedením nové sekvence primerů pro detekci DNA prasete. Tímto krokem se laboratoř nejen srovnala se standardním

příslušnou DNA (v tomto případě prasete). Kalibrační křivka byla připravena z roztoků zaslaných EURL-AP. Z ní byl vypočten limit detekce. Pro 0,01% kontaminaci odpovídá pěti kopiím DNA, přítomným v roztoku. Pro představu, kalibrační roztoky EURL-AP měly koncentraci 640 kopií DNA, což odpovídá 5% kontaminaci krmiva, 170 kopií DNA, což odpovídá 1% kontaminaci krmiva, a konečně

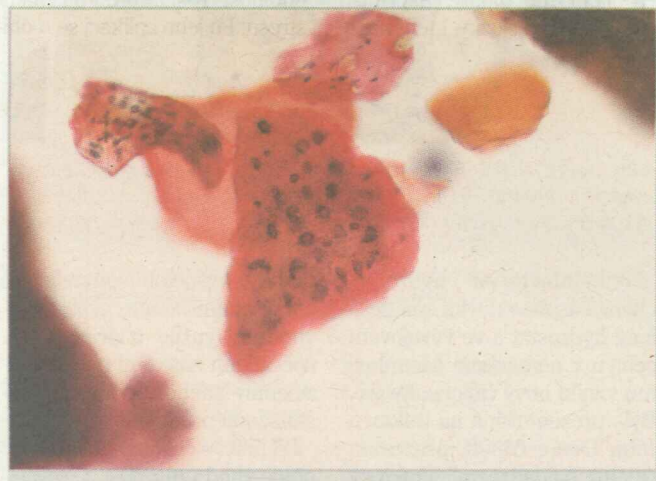
do 50,00 cyklu, byly již negativní. Pokud ale reagovaly do 37,29 cyklu, byly vyhodnoceny jako pozitivní.

Uvedený výsledek umožnil laboratoři věnovat se implementačnímu testu EURL-AP. Opakovaním uvedeného testu došla laboratoř ke srovnatelným výsledkům a mohla vydat výsledek EURL-AP. Evropská referenční laboratoř po měsíci hodnocení poslala tabulku s vý-

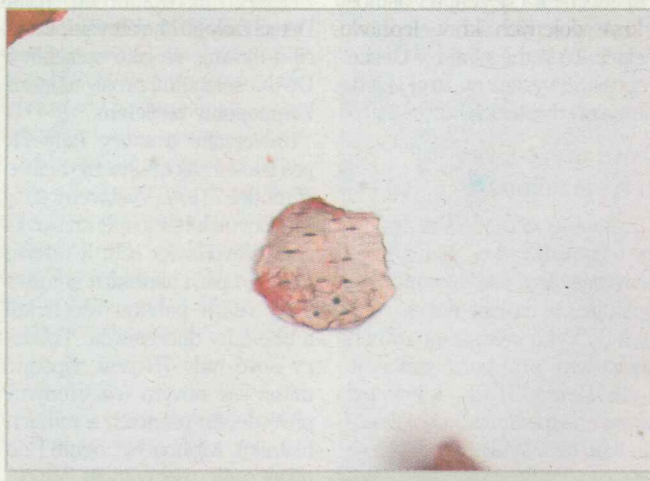
posud metodou, která doplňuje a upřesňuje nález z mikroskopické detekce živočišných komponent.

Porovnání metod mikroskopické a RT-PCR

Metoda mikroskopická je výrazně citlivější, umožňuje odhalit přítomnost živočišných tkání v krmivu již na hranici setin procenta. Nevýhodou této metody je ale skutečnost, že odborník,



Obr. 4 – Drůbeží kost při 200 násobném zvětšení Foto Michaela Růžková



Obr. 5 – Kost savců při 200násobném zvětšení Foto Michaela Růžková

Vedoucí chovu skotu

Pro zavedenou farmu na Šumavě
hledáme vedoucího chovu masného skotu
(400 matek plemene Limousine).

Náplň práce:

- vedení plemenitby, telení krav, vedení porodu
- ošetření telat po porodu a následná péče
- starost o pastevní areály, pastvu
- zodpovědnost za ekonomiku chovu
- vedení zaměstnanců
- aktivní zapojení do všech činností vč. manuálních prací

Požadujeme:

- SŠ / VŠ veterinární nebo zootechnické vzdělání
- praxi v oboru, zkušenost s chovem a telením
- flexibilitu, spolehlivost, zodpovědnost, aktivní přístup
- řidičský průkaz sk. B (sk. T výhodou)
- němčina výhodou (školicí pobyty v zahraničí)

Nabízíme:

- nadprůměrné platové ohodnocení
- zajímavý bonus dle výsledků (až 400 000 Kč)
- možnost ubytování
- zázemí stabilní společnosti

Svůj životopis zašlete na e-mail sevicova@agromap.cz