



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNALEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

210898

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 12 11 79
(21) (PV 7702-79)

(51) Int. Cl.³
A 61 K 39/395

(40) Zveřejněno 30 06 81

(45) Vydáno 15 09 83

(75)

Autor vynálezu

RODÁK LADISLAV MVDr. CSc., BRNO

(54) Způsob přípravy třídivě specifických precipitačních antisér proti imunoglobulinům tříd IgA a IgM skotu a prasat

Způsob přípravy třídivě specifických antisér proti imunoglobulinům tříd IgM a IgA skotu a prasat, použitelných ve veterinární medicíně a imunodiagnostice.

Účelem vynálezu je stanovení účinného a poměrně jednoduchého způsobu přípravy antisér, která jsou nutná ve výzkumu i při rozvoji nových imunodiagnostických metod. Uvedeného účelu se dosáhne tím, že se produkční zvířata nejprve imunizují intradermálně antigenem, homogenizátem precipitačních linií imunoglobulinů zvolené třídy v kompletním Freundově adjuvansu a po vytvoření imunitní paměti se dvakrát intramuskulárně imunizují stejným antigenem o 5x vyšší koncentraci v inkompletním adjuvansu. Potom se 3x parenterálně imunizují dávkou 5 až 10 mg imunoglobulinu v solubilní formě. Produkční zvířata se vykrví 5. až 7. den po poslední dávce antigenu. Získané antisérum se vysytí pomocí imunosorbentu s navázaným imunoglobulinem odlišné třídy nebo lehkými řetězci imunoglobulinových molekul stejného druhu zvířat.

Vynálezu může být využito také pro komerční účely v podnicích zabývajících se výrobou biopreparátů a imunodiagnostik.

Předmětem vynálezu je způsob přípravy vysoce avidních precipitačních antisér proti imunoglobulinům tříd IgA a IgM skotu a prasat.

Při přípravě monospecifických antisér proti jednotlivým třídám imunoglobulinů je nutné zvířata imunizovat ideálně čistými proteiny, k jejichž izolaci je používána gelová filtrace, iontoměničová chromatografie, isoelektrické fokusace, ultracentrifugace, preparativní elektroforéza, imuno elektroforéza a řada jiných metod. Ani použití těchto postupů však většinou nezaručuje absolutní čistotu izolovaných imunoglobulinů.

Stopy příměsí vyvolávají tvorbu protilátek s nežádoucí specifitou a vyrobená antiséra vytvářejí precipitační linie nejen s požadovaným, ale i s jinými třídami imunoglobulinů a dalšími vysoce antigenními proteiny, jako jsou např. lipoprotein, alfa-2-makroglobulin nebo transferrin. U řady zvířat používaných k produkci antisér, zejména u králíků, je třeba počítat i s tím, že vytvořené protilátky reagují nejen s třídově specifickými antigenními determinantami těžkých řetězců, ale i s determinantami lehkých řetězců, které jsou pro všechny třídy imunoglobulinů společné. Příprava třídově specifických a dostatečně avidních antisér je proto značně náročná po odborné i materiální stránce.

Potřeba třídově specifických antisér ve veterinární medicíně stále vzrůstá s rozvojem nejrůznějších metod, které jsou používány nejen v imunologickém, bakteriologickém, virologickém, parazitologickém popř. i jiném výzkumu, ale i při praktické diagnostice nejrůznějších patofyziologických stavů. Tím citelněji se projevuje nedostatek jednoduchého způsobu získávání třídově specifických antisér pro zmíněné účely.

Obtíže spojené se získáváním třídově specifických a avidních antisér proti imunoglobulinovým třídám skotu a prasat, zahrnující přípravu ideálně čistých tříd imunoglobulinu jako antigenů k imunizaci zvířat a vlastní imunizaci zvířat, odstraňuje způsob imunizace zvířat podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se zvolená zvířata podrobí imunizaci antigen-protilátkovým komplexem, např. precipitačními liniemi, vytvořenými reakcí imunoglobulinů tříd IgM a IgA s odpovídající specifickou protilátkou v agarovém gelu.

Produkční zvířata, s výhodou králíci, se nejdříve intradermálně imunizují emulzí připravenou smíšením 1 dílu homogenizátu precipitačních linií ve fyziologickém roztoku (2 až 4 precipitační linie/ml) a 2 dílů kompletního Freundova adjuvans. Po vytvoření imunitní paměti se králíci 2x v odstupu 10 dnů imunizují emulzí připravenou smíšením 1 dílu homogenizátu precipitačních linií (10 až 20 linií/ml) a 2 dílů inkompletního adjuvans.

Po dalších 10 dnech se králíci ve 3 následujících dnech imunizují parenterálně roztokem požadovaného imunoglobulinu v dávce 5 až 10 mg/imunizaci/králíka. Vykrvení následuje 5 až 7 den po poslední imunizaci. Získané antisérum se vysytí pomocí imunosorbentu s navázaným imunoglobulinem odlišné třídy nebo lehkými řetězci imunoglobulinových molekul stejného druhu zvířat.

Způsob imunizace zvířat podle vynálezu je vhodný zejména k přípravě třídově specifických antisér proti jednotlivým třídám imunoglobulinů, které dosud známým způsobem nelze jednoduše připravit.

Hovězí a prasečí imunoglobuliny třídy IgM se izolují z krevních sér isoelektrickou precipitací v roztoku 0,05 M kyseliny borité a opakovanou gelovou filtrací na koloně Sephadexu G 200. Prasečí imunoglobuliny třídy IgA se izolují ze séra, hovězí imunoglobuliny třídy IgA z kolostra, slin aj.

Získané imunoglobuliny tříd IgM a IgA není možno použít k imunizaci zvířat přímo, protože stopy příměsí vyvolávají u imunizovaných zvířat tvorbu protilátek nežádoucí specifity. Proto při výrobě antisér proti těmto třídám imunoglobulinů jsou jako antigeny používány antigen-protilátkové komplexy, s výhodou precipitační linie, vytvořené reakcí imunoglobuli-

nů tříd IgM a IgA s odpovídající specifickou protilátkou v agarovém gelu (Nansen, P. 23.: Acta path. microbiol. scand. Scot. B 1971, 79, s 459). Teprve v poslední fázi imunizace se smí použít roztoky těchto imunoglobulinů, kdy již nedochází k tvorbě nespecifických protilátek, avšak výrazně se zvyšuje precipitační aktivita antisér. Tím odpadá nutnost použití mimořádně pracných a odborně, časově i materiálově náročných izolačních postupů při přípravě čistých imunoglobulinů jednotlivých tříd. Základní předpoklad výroby antisér, tj. přípravu vhodných antigenů, je tak možno vytvořit i v laboratořích, které nejsou vybaveny špičkovou technikou.

Příklad provedení přípravy antisér

Při přípravě antisér se používají purifikované prasečí a hovězí imunoglobuliny tříd IgA a IgM. Jejich další zpracování a způsob imunizace se provádí jednotným způsobem podle následujícího příkladu přípravy králičího třídově specifického antiséra proti prasečímu IgA imunoglobulinu.

Do startů o průměru 1 až 2 mm, vyrytých v 1,5 %-Noble agaru pro imuno elektroforézu, se nanese roztok prasečího IgA imunoglobulinu v koncentraci 10 až 20 mg/ml o čistotě 70 až 90 %. Po elektroforetickém rozdělení se do žlábků nanese králičí třídově specifické antisérum proti prasečímu IgA. Po 48 hodinách inkubace ve vlhké komoře při 20 °C se pomocí žiletky vyříznou části precipitačních linií vytvořené v rozsahu start-katoda, důkladně 2 dny vyperou v pufovaném fyziologickém roztoku a zhomogenizují. Homogenizáty precipitačních linií (antigen-protilátkový komplex), dále antigenní suspenze, se používají různé koncentrované: pro 1. imunizaci 2 až 4 precipitační linie/ml, pro 2. až 3. imunizaci 10 až 20 precipitačních linií/ml.

Při 1. imunizaci se králík intradermálně imunizuje emulzí připravenou smíšením 1 dílu antigenní suspenze (2 až 4 homogenizované precipitační linie v 1 ml) a 2 dílů kompletního Freundova adjuvans (á 0,2 ml emulze i. d. na 6 míst na hřbetě). Za 1 měsíc následují v desetidenním intervalu 2. až 3. intramuskulární injekce emulze připravené smíšením 1 dílu antigenní suspenze (10 až 20 homogenizovaných precipitačních linií v 1 ml) a 2 dílů inkompletního adjuvans (á 0,5 ml emulze i. m. na 6 míst). 10. až 12. den po 3. imunizaci následují ve 3 dnech 4. až 6. parenterální injekce roztoku prasečího IgA (1 imunizační dávka cca 5 mg prasečího IgA ve 3 ml fyziologického roztoku). Tyto poslední injekce dále podstatně zvyšují precipitační aktivitu králičího antiséra.

Protože vykrvení následuje 5. až 7. den po poslední injekci, zvyšuje se zejména hladina specifických protilátek (sekundární typ imunitní odpovědi), zatímco primární imunitní odpověď na přítomné jiné antigeny je zanedbatelná. Proto je možno k těmto imunizacím použít jen částečně purifikovaný IgA imunoglobulin. Získané antisérum se vysytí pomocí imunosorbentu s navázaným prasečím IgG, popř. IgM imunoglobulinem nebo lehkými řetězci imunoglobulinových molekul. Získané antisérum je třídově specifické, reagující pouze se specifickým, tj. těžkým řetězcem IgA molekuly.

Podle stejného postupu a při dodržení stejných zásad se provádí příprava třídově specifických antisér proti hovězím IgA nebo hovězím a prasečím IgM imunoglobulinům. Postupy vždy zahrnují přípravu precipitačních linií požadovaného antigenu s protilátkou a homogenizaci precipitačních linií. Pro 1. imunizaci se používá emulze 1 dílu homogenizátu precipitačních linií (2 až 4 linie v 1 ml) a 2 dílů kompletního Freundova adjuvans. Pro 2. až 3. imunizaci se používá emulze 1 dílu homogenizátu precipitačních linií (10 až 20 linií v 1 ml) a 2 dílů inkompletního adjuvans.

Při postupu je třeba dodržet požadavek, aby koncentrace antigenu (antigen-protilátkového komplexu precipitačních linií) v roztocích použitých při přípravě emulzí pro 2. až 3. imunizaci byla vždy několikanásobně vyšší než při 1. imunizaci (koncentrace odpovídající 10 až 20, případně 2 až 4 precipitačních linií v 1 ml). Následují 4. až 6. injekce roztoků

antigenů (5 až 10 mg IgA nebo IgM imunoglobulinu v 1 imunizační dávce) a vykrvení králíků 5. až 7. den po poslední injekci. Získaná antiséra se nakonec vysytí pomocí imunosorbentů s návaznými imunoglobuliny jiných tříd nebo lehkými řetězci imunoglobulinových molekul. K vysycení antisér proti IgA používáme IgG a IgM imunoglobuliny atd.

Předmět vynálezu řeší dílčím způsobem přípravu třídově specifických antisér proti imunoglobulinovým třídám IgM a IgA skotu a prasat. Problém byl řešen komplexně a přípravu antisér proti třídám IgG skotu a prasat řeší čs. AO č. 210897.

Požadované vlastnosti třídově specifických antisér proti prasečím a hovězím třídám imunoglobulinů získaných podle vynálezu se dokazují imunoprecipitačními testy v agaru: dvojitou radiální imunodifúzí (Ouchterlony) a imuno elektroforézou. Třídově specifická antiséra vytvářejí s prasečími a hovězími krevními séry nebo kolostry, popř. purifikovanými imunoglobuliny, pouze jedinou precipitační linii podle své specifity.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy třídově specifických, vysoce avidních precipitačních antisér proti imunoglobulinovým třídám IgM a IgA skotu a prasat, spočívající v tom, že na počátku imunizačního postupu se jako antigen použijí antigen-protilátkové komplexy, s výhodou homogenizáty precipitačních linií, připravené reakcí imunoglobulinů tříd IgM a IgA s odpovídající specifickou protilátkou v agarovém gelu, vyznačující se tím, že se produkční zvířata, s výhodou králíci, nejdříve intradermálně imunizují emulzí antigen-protilátkového komplexu o koncentraci 2 až 4 precipitační linie/ml v kompletním Freundově adjuvans, po vytvoření imunitní paměti se dvakrát intramuskulárně imunizují emulzí antigen-protilátkového komplexu o koncentraci 10 až 20 precipitačních linií/ml v inkompletním adjuvans, potom se třikrát parenterálně imunizují vždy dávkou 5 až 10 mg imunoglobulinu požadované třídy v solubilní formě, potom se produkční zvířata vykrví 5. až 7. den po poslední dávce antigenu a získané antisérum se vysytí pomocí imunosorbentů s navázaným imunoglobulinem odlišné třídy nebo lehkými řetězci imunoglobulinových molekul stejného druhu zvířat.