ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

FEDERÁLNÍ ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(11) 264 508

(13) B1

(21) PV 8738-84
(22) Přihlášeno 16 11 84

(40) Zveřejněno 15 11 88
(45) Vydáno 14 12 90

(51) Int. Cl.[4]
G 01 N 33/53

(75)
Autor vynálezu

FRANZ JAROSLAV RNDr. CSc., SVOBODA IVAN prom. chem., BRNO,
MACURA BŘETISLAV MVDr., DEDEK LADISLAV MVDr. CSc., OPAVA

(54) Způsob přípravy antigenu virové leukózy skotu pro imunoenzymatickou a radioimunologickou metodu

(57) Podstatou řešení je způsob přípravy antigenu virové leukózy skotu pro ELISA (imunoenzymatickou) a RIA (radioimunologickou) metodu diagnostiky, kde se ke kultivaci buněčné linie infikované virem leukózy skotu používá sérum prosté nespecifických inhibitorů v koncentraci 5 až 10 % objemových při teplotě 35 až 38 °C po dobu 2 až 6 dnů. Po sklizni se virus dále čistí tím, že se odstraní buňky z média a přidá se roztok polyethylenglykolu a mol. hmotnosti 6 000 v minimálním esenciálním médiu do konečné koncentrace 6 až 9 % objemových. Směs se inkubuje po dobu 18 až 72 hodin při teplotě 2 až 5 °C a po vysrážení se odstraní kapalná část a virus se resuspenduje v pufrovaném fyziologickém roztoku a pak se provede lyofilizace. Lyofilizovaný antigen je možno použít do ELISA a RIA souprav k diagnostice leukózy skotu.

CS 264 508 B1

Vynález řeší způsob přípravy antigenu virové leukózy skotu pro imunoenzymatickou (ELISA) a radioimunologickou (RIA) metodu k diagnostice leukózy skotu.

Výskyt virové leukózy skotu je znám již z minulého století, ale bez znalosti etiologie onemocnění. V českých zemích se soustředila pozornost na virovou leukózu skotu koncem 50. a počátkem 60. let (Pecháč, Žák: Lymfatická leukemie u skotu, Veterinářství, 8, 1958, s. 169—171, Procházka J.: Leukemie u skotu, Veterinářství, 12, 1982, s. 31—32), kdy bylo popsáno tumorózní onemocnění lymfatického systému skotu. Mnoho let až do nedávné minulosti se diagnostika virové leukózy opírala o průkaz perzistentních lymfosarkomatóz, nebo klinicky a patoanatomicky zjištěné tumorózní formy uvedeného onemocnění. V ČSSR až do r. 1980 byla pro diagnostiku používána hematologická metoda, používající klíče Rademachra a Krause (Rademacher R., Kraus J.: Studie k hematologickému klíči pro diagnostiku leukózy červenostrakatého skotu v ČSSR. Vet. Med., 1967, 12, s. 679—686). Pokusy o potlačení nebo dokonce ozdravení chovů od leukózy byly založeny na rozsáhlém hematologickém vyšetření, zaměřeném na vyhledávání zvířat v leukemické fázi onemocnění. Pokusy o eradikace leukózy se nezdařily ani po 10letém používání hematologických metod. (Hittman G.: Erfahrungen bei der Bekänpfengen der Rinderleukose, Dtsch. T. WSCHR., 83, 1976, s. 434). Prudký zvrat v pojetí boje proti EBL je spojen s objasněním etiologického agens, kterým je virus zařazený do skupiny retrovirů (Miller J. M. a kol.: Virus-like particles in phytohemaglutinin stimulated lymfocyted lymfocyte culteres with reference to bovine lymfosarcoma. J. Natl. Canc. Inst., 1969, 43, s. 1297—1305). Z moderních virologických metod pro diagnostiku leukózy skotu našly největšího uplatnění virologicko-sérologické metody. V ČSSR se v současné době nejčastěji používá imunodifuzní test (Hofírek B., Vařejka F.: Použití imunodifuze v sérologické diagnostice enzootické leukózy skotu, Veterinářství, 1978, 28, s. 154—156, Hofírek B.: Výskyt protilátek proti glykoproteinovému antigenu (gp 70) viru enzootické leukózy v leukózním stádu, Vet. med., 1980, 25, s. 449—455). Velmi citlivou, přesnou, ale také pracnou je metoda neutralizačního testu v plakové modifikaci (Závada J. a kol.: Pseudoty particles of vesicular stomatitis virus with surface antigens of bovine leukemia virus VSV (BVL) — as a senstitive probe for detecting antibodies in the sera of spontaneously infected cattle, Acta Virol., Praha, 1978, 22, s. 91—96).

K diagnostice se také používají imunoanalytické testy ELISA a RIA. (Ressang A. A. a kol.: Studies on bovine leukosis. VII. Further experience with an ELISA for the detection of antibodies to bovine leukosis virus. Vet. Quarterly, 1981, 3, s. 31—33, Altaner Č. a kol.: A Simple and Inexpensive Method for Detection of BVL infected Cattle based an a modified ELISA principe. Zbl. Vet. Med. B, 29, 1982, s. 583—589), které splňují požadavky kladené na

moderní metody a jejichž zavádění je perspektivní i v diagnostických laboratořích.

Základním předpokladem pro širokou aplikaci těchto metod v ČSSR bylo vyrobit antigen jednoduchou a levnou metodou v dostatečném množství a vysoké kvalitě. Specifita a citlivost ELISA a RIA testů je dána mimo jiné kvalitou použitého antigenu. Uvedené požadavky splňuje antigen připravený podle vynálezu. Podstatou vynálezu je způsob přípravy antigenu virové leukózy skotu pro ELISA (imunoenzymatickou) a RIA (radioimunologickou) metodu diagnostiky, kde se ke kultivaci buněčné linie, infikované virem leukózy skotu, používá sérum prosté nespecifických inhibitorů v koncentraci 5 až 10 % objemových při teplotě 35 až 38 °C po dobu 2 až 6 dnů. Po sklizni viru se dále čistí tím, že se odstraní buňky z média a přidá se roztok polyethylenglykolu o molekulové hmotnosti 6 000 v minimálním esenciálním médiu do konečné koncentrace 6 až 9 % objemových. Směs se inkubuje po dobu 18 až 72 hodin při teplotě 2 až 5 °C a po vysrážení se odstraní kapalná část a virus se resuspenduje v pufrovaném fyziologickém rozboru a pak se provede lyofilizace.

Způsob přípravy antigenu podle vynálezu ilustruje dále uvedený příklad:

1. Připraví se růstové médium následujícího složení:

Minimální esenciální médium 10× koncentrované . . . . . 90 cm³
Destilovaná sterilní voda pro buněčné kultury ad . . . . . 900 cm³
Prekolostrální sérum prosté nespecifických inhibitorů . . . . . 100 cm³
Roztok (7,5%) uhličitanu sodného . . . . 10 cm³
Draselná sůl penicilinu . . . . . 100 mj/cm³
Síran streptomycinu 100μg/cm³
Síran kanamycinu . . . . . 100 μg/cm³
Polymixin B . . . . . 50 μg
Fungicidin . . . . . 50 mj/cm³

2. Pomocí trypsin-versenačního roztoku se ze 2 až 3 dny starých, kompletně narostlých kultur buněčné linie sleziny jehněte, permanentně infikované virem leukózy skotu, připraví buněčná suspenze, k jejíž přípravě se použije médium výše uvedeného složení. Pasážování kultur se provádí v poměru 1 : 3 až 1 : 5. Buněčné kultury se po rozplnění do kultivačních nádob inkubují při 37 °C 2 až 6 dnů. Po ukončení inkubace se médium obsahující antigen a buněčný detritus odstraní buď centrifugací v chlazené odstředivce při 2 500 otáčkách/min po dobu 20 minut, nebo filtrací přes předfiltr s póry většími jak 1 μm.

3. Připraví se 40% roztok polyethylenglykolu 6 000 v minimálním esenciálním médiu:

Polyethylenglykol mol. hmot. 6 000 . . . . 400 g
Minimální esenciální médium ad . . . 1 000 cm³

Roztok polyethylenglykolu se rozplní do NTS lahví, které se uzavřou gumovou zátkou a sterilizují se po dobu 20 minut při teplotě 115 °C.

4. K médiu obsahujícímu virový antigen se přidá výše připravený roztok polyethylenglykolu 6 000 v takovém množství, aby jeho konečná koncentrace byla 60 až 90 g na jeden litr

směsi. Precipitace virového antigenu probíhá při +4 °C po dobu 18 až 72 hodin, poté se provede centrifugace v chlazené odstředivce při +4 °C (3 000 otáček/min.) po dobu 30 minut. Po ukončení centrifugace se supernatant odstraní a sediment antigenu se resuspenduje v pufrovaném fyziologickém roztoku na optimální koncentraci pro ELISA nebo RIA test. K získanému antigenu se přidá vhodné protektivní médium a v lékovkách rozplněný antigen je lyofilizován.

Antigen připravený podle vynálezu byl používán v ELISA a RIA testech, které byly srovnávány s plak redukčním (PR) a imunodifuzním (ID) testem. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1 — Porovnání citlivosti diagnostického testu ELISA, RIA a ID testu proti plak redukčnímu testu

Plak redukční test/n	%								
	ELISA			RIA			ID		
	pozit.	dubioz.	negat.	pozit.	dubioz.	negat.	pozit.	dubioz.	neg.
Pozitivní/64	98	0	2	95	0	5	81	17	2
Dubiozní/6	33	17	50	67	0	33	17	0	83
Negativní/32	3	9	87	16	0	84	0	0	100

Z výsledků uvedených v tabulce 1 vyplývá, že shoda mezi plak redukčním testem a ELISA metodou byla u pozitivních případů 98%, mezi plak redukčním testem a RIA metodou byla 95% shoda pozitivních výsledků a u imunodifuzního testu byla shoda v 81 %.

Tabulka 2 — Porovnání citlivosti plak redukčního, ELISA a imunodifuzního testu při diagnostice leukózy skotu

	%			% shody
	pozitivní	dubiozní	negativní	
Plak redukční test	52	1	47	100
ELISA test	46	1	53	88,4
Imunodifuzní test	38	3	59	73

Z tabulky 2 vyplývá, že nejcitlivější metodou byl plak redukční test, pak ELISA test s 88,4%, shodou výsledků a poslední byl imunodifuzní test.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy antigenu virové leukózy skotu pro imunoenzymatickou a radioimunologickou metodu kultivací viru leukózy skotu v infikovaných buněčných kulturách sleziny jehněte se sérem prostým nespecifických inhibitorů v koncentraci 5 až 10 % objemových při teplotě 35 až 38 °C po dobu 2 až 6 dnů a po sklizni viru dalším čištěním, vyznačený tím, že se odstraní buňky, s výhodou filtrací nebo odstředěním, přidá se roztok polyethylenglykolu v minimálním esenciálním médiu do výsledné koncentrace polyethylenglykolu 6 až 9 % hmotnostních, nechá se působit 18 až 72 hodin při teplotě 2 až 5 °C a po vysrážení viru se odstraní kapalná část a virus se resuspenduje v pufrovaném fyziologickém roztoku.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se používá polyethylenglykolu o molekulové hmotnosti 6 000.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se výsledný produkt lyofilizuje.