



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

248247
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 33/535

(22) Prihlášené 08 10 85

(21) (PV 7180-85)

(40) Zverejnené 12 06 86

(45) Vydané 15 07 88

(75)

Autor vynálezu

GREŠÍKOVÁ MILOTA MUDr. DrSc. člen korešpondent ČSAV a SAV,
SEKEYOVÁ MAGDALÉNA PhMr., BRATISLAVA, KOŽUCH OTO MUDr. CSc.,
MALACKY, BIELIKOVÁ VALÉRIA, SIEBENSTICHOVÁ MARTA,
BRATISLAVA

(54) **Spôsob výberu kmeňov vírusov hemorhagickej horúčky s renálnym
syndrómom imunoenzymatickou metódou**

1

2

Účelom riešenia je výber kmeňov hemorhagickej horúčky s renálnym syndrómom imunoenzymatickou metódou.

Uvedeného účelu sa dosiahne tak, že na film imúnneho gamaglobulínu obsahujúceho protilátky k vírusu hemorhagickej horúčky s renálnym syndrómom sa nanesie číry testovaný materiál, po premytí a vysušení sa nanesie anti-imunoglobulín označený enzýmom peroxidázou, alebo fosfatázou po opätovnom premytí sa pridá 1,4-diamínobenzén alebo 4-nitrofenylfosfát, reakcia sa zastaví po 30 až 45 min a 1 až 1,01 mól.l⁻¹ roztokom kyseliny sírovej a sfarbenie sa vyhodnotí vizuálne alebo fotometricky.

Spôsob výberu kmeňov hemorhagickej horúčky s renálnym syndrómom má použitie v zdravotníctve.

Vynález sa týka spôsobu výberu kmeňov vírusov hemorhagickej horúčky s renálnym syndrómom (HFRS) západného typu imunoenzymatickou (EIA) metódou.

Hemorhagická horúčka s renálnym syndrómom predstavuje vo svete, najmä v Ázii a Európe vážny verejno-zdravotnícky problém [C. Gajdušek: WHO Report (1982)]. Doteraz vo svete sa robili pokusy na zachytenie vírusu, respektíve vírusového antigénu hemorhagickej horúčky s renálnym syndrómom z pľúc drobných hlodavcov nepriamou imuno fluorescenciou [H. W. Lee, P. W. Lee, I. J. Back, K. Tsuchiya, R. S. Foulke: Am. J. Trop. Med. Hyg. 30, 477 (1981); M. Brummer-Korvenkontio, A. Vaheri, T. Hovi, C. H. von Bonsdorf, J. Vuorimies, T. Manni, K. Penttinen, N. Oker-Blom, J. Lahdevirta: J. Infect. Dis. 141, 131 (1980); I. N. Gavrilovskaya, N. S. Apekina, Yu. A. Myasnikov, A. D. Bernshtein, E. V. Ryltseva, E. A. Gorbachkova, A. D. Chumakov: Arch. Virol. 75, 313 (1983); M. Grešíková, J. Rajčáni, M. Sekeyová, M. Brummer-Korvenkontio, O. Kožuch, M. Labuda, R. Turek, P. Weismann, J. Nosek, J. Lysý: Acta virol. 28, 416 (1984)], alebo na bunecnej línii z ľudských karcinomatóznych pľúc (A 549) ako i na stabilizovanej bunecnej línii z obličiek zelených opíc (VERO klón F6 bunkách) [G. R. French: Abstract V. Int. Symp. Virology (1981); T. Kitamura, M. Chiharu, K. Toshihiko, S. Kazuyoshi, A. Jiro, S. Sadashi, T. Hisao, A. Yoriyuki, I. Kiyoshi: JPN J. Med. Sci. Biol. 36, 17 (1983)].

Nevýhodou doteraz používaných metodík je veľká prácnosť. Metodika prípravy ultra tenkých rezov z pľúc hlodavcov a následný dôkaz antigénu nepriamou imuno fluorescenciou je zdĺhavá. Podobne metodika kultivácie suspenzií z pľúc drobných hlodavcov na bukách je práčna, pretože až po niekoľkých slepých pasážach sa dá dokázať antigén hemorhagickej horúčky s renálnym syndrómom v cytoplazme buniek pomocou nepriamej imuno fluorescencie.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že sa na film imúnneho gama globulínu, obsahujúceho protilátky k vírusu hemorhagickej horúčky s renálnym syndrómom po vymytí a vysušení naniesú číre testované materiály, a potom sa po premytí a vysušení naniesie anti-imunoglobulín, značený enzýmom peroxidázou, alebo fosfatázou po opätovnom premytí sa pridá 1,4-diamínobenzén, alebo 4-nitrofenylfosfát, reakcia sa zastaví po 30 až 45 min s 1 až 1,01 $\text{m} \cdot \text{l}^{-1}$ roztokom kyseliny sírovej a sfarbenie sa vyhodnotí vizuálne alebo fotometricky.

Imunochemické reakcie, t. j. reakcie antigénov s protilátkami sa využívajú veľmi často k dôkazu biologicky aktívnych látok pre svoju vysokú špecifickosť a citlivosť. Významným markerom antigénov a protilátok sú enzýmy. Tieto boli použité na označenie protilátok k detekcii antigénov v histologických preparátoch a ku zviditeľneniu sla-

bých precipitačných línii pri imunodifúzných technikách v agarovom géle.

Ako sa ukázalo, enzýmové konjugáty sa veľmi hodia k histologickým a cytologickým vyšetreniam, pretože oproti klasickej imuno fluorescencii majú veľkú výhodu nielen vo vyššej citlivosti, stálosti preparátov a použiteľnosti i pri elektrónovej mikroskopii, ale predovšetkým v možnosti pozorovať súčasne i tkaninové bunecné štruktúry a zistiť tak presnú lokalizáciu hľadaného antigénu.

Po príprave prvých enzýmových konjugátov sa zrodila tzv. metóda „enzymeimmunoassay“ EIA, u ktorej sa hodnotí enzýmová aktivita, a to spravidla pomocou rozkladu vhodného substrátu, ktorý poskytuje farebné reakčné produkty.

Vzhľadom k tomu, že asociačné konštanty komplexu antigén-protilátka sú v optimálnych prípadoch rádu $10^{-12} \text{ m} \cdot \text{l}^{-1}$ je citlivosť imunoenzymatickej metódy EIA rádu až $10^{-15} \text{ m} \cdot \text{l}^{-1}$. Imunoenzymatické metódy vyhovujú moderným požiadavkám na vyhodnocovanie, na presnosť a reprodukovateľnosť.

Výhoda spôsobu výberu kmeňov vírusov hemorhagickej horúčky s renálnym syndrómom imunoenzymatickou metódou spočíva v úspore materiálu: médií, sér a buniek.

Ďalšou výhodou je, že navrhované riešenie je časovo úsporné, znižuje sa prácnosť a rizikovosť z hľadiska bezpečnosti pri práci.

Príklad 1

Na polystyrénové mikroplatničky sa naniesie po 0,05 ml špecifický ľudský gama globulín, obsahujúci protilátky k hemorhagickej horúčke s renálnym syndrómom. Po adsorpcii gamaglobulínu na tvrdú podložku počas 18 hodín (cez noc) pri teplote 22 °C sa jamky 3krát premyjú s 0,01 $\text{m} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátovým pufrum o pH 7,2 s prímiesou 0,5 % hmot. polyoxyetylén 20 sorbitant monolaurátu (Tweenu 20) o molekulovej hmotnosti 1200.

Zloženie fosfátového pufru:

Pripraví sa fosfátmi tlmenný fyziologický roztok o pH 7,2. Roztok A: 8 g chloridu sodného, 0,20 g chloridu draselného, 2,89 hydrogénfosforečnanu sodného, 0,20 g dihydrogénfosforečnanu draselného sa rozpustí v redestilovanej vode a roztok sa doplní redestilovanou vodou na objem 800 ml. Roztok B: 0,1 g chloridu vápenatého sa rozpustí v 100 ml redestilovanej vode. Roztok C: 0,1 g hexahydrát chloridu horečnatého sa rozpustí v 100 ml redestilovanej vody.

Roztoky A, B a C sa zmiešajú a potom sa pridá 0,5 % hmot. polyoxyetylén 20 sorbitant monolaurátu. Po premytí a vysušení platničiek sa pridajú vyčistené suspenzie z

plúc drobných hlodavcov po 0,05 ml. Po adsorpcii antigénu pri teplote 4 °C počas 18 h sa jamky opätovne premyjú s fosfátovým pufrom s prímiesou 0,5 % hmot. polyoxyetylén 20 sorbitant monolaurátu. Po vysušení sa pridáva antiglobulín, označený enzýmom peroxidáciou. Po trojnásobnom premytí sa pridá 1,4-diamínobenzén. Reakcia sa zastaví po 30 minútach 1 mól.l⁻¹ roztokom kyseliny sírovej. Výsledky sa odčítajú na fotometri (Microelisa MR 590) pri vlnovej dĺžke 210 nm alebo vizuálne.

Pozitívne reagujúce vzorky sa vyberú na kultiváciu na stabilizovanej bunečnej línii z obličiek zelených opíc (VERO klón E6 bunkách). Tieto stabilizované bunečné línie sú uložené vo Virologickom ústave SAV, Mlynská dolina 1, 817 03 Bratislava.

Príklad 2

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa použije krv chorého človeka, alebo vyčírené orgány (plúca, obličky) post mortem. Na film imúnneho gamaglobulínu, obsahujúceho protilátky k vírusu hemorhagickej horúčky s renálnym syndrómom sa naniesie číry testovaný materiál a potom sa po premytí a vysušení naniesie antiimmunoglobulín, značený enzýmom peroxydázou; po opätovnom premytí sa pridá 1,4-diamínobenzén; reakcia sa zastaví po 30 min s 1 mól.l⁻¹ roztokom kyseliny sírovej a sfarbenie sa vyhodnotí vizuálne alebo fotometricky pri vlnovej dĺžke 210 nm.

Príklad 3

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa použije moč chorého človeka, upravený na neutrálne pH. Na film imúnne-

ho gamaglobulínu s protilátkami k hemorhagickej horúčke s renálnym syndrómom sa naniesie moč pacienta. Po adsorpcii pri teplote 4 °C počas 18 hodín sa jamky opätovne 3krát premyjú s fosfátovým pufrom s prímiesou 0,5 % hmot. polyoxyetylén 20 sorbitant monolaurátu. Po vysušení sa pridá antiimmunoglobulín, značený enzýmom peroxydázou. Po trojnásobnom premytí s fosfátovým pufrom sa pridá 1,4-diamínobenzén (ortofenyléndiamín). Reakcia sa zastaví po 30 minútach s 1 mól.l⁻¹ roztokom kyseliny sírovej. Výsledky sa odčítajú na fotometri pri vlnovej dĺžke 210 nm alebo vizuálne. Pozitívne reagujúce vzorky sa vyberú na kultiváciu na stabilizovanej bunečnej línii z obličiek zelených opíc (VERO klón E6 bunkách).

Príklad 4

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa použije antiglobulín, označený enzýmom alkalickou fosfatázou. Po trojnásobnom premytí sa pridá dvojsodná soľ 4-nitrofenylfosfátu. Reakcia sa nechá prebiehať v tme a potom sa zastaví po 45 minútach 1,01 mól.l⁻¹ roztokom kyseliny sírovej. Výsledky sa odčítajú na fotometri pri vlnovej dĺžke svetla 490 alebo vizuálne. Pozitívne reagujúce vzorky sa vyberú na kultiváciu na stabilizovanej bunečnej línii z obličiek zelených opíc (VERO klón E6 bunkách).

Spôsob výberu kmeňov hemorhagickej horúčky s renálnym syndrómom môže nájsť široké uplatnenie v zdravotníctve na izoláciu kmeňov hemorhagickej horúčky s renálnym syndrómom, titráciu i identifikáciu uvedených kmeňov vírusov.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob výberu kmeňov vírusov hemorhagickej horúčky s renálnym syndrómom imunoenzymatickou metódou, vyznačujúci sa tým, že na film imúnneho gamaglobulínu, obsahujúceho protilátky k hemorhagickej horúčke s renálnym syndrómom po premytí a vysušení sa naniesú číre testované materiály a potom sa po premytí a vysušení na-

nesie antiimmunoglobulín, značený enzýmom peroxydázou, alebo fosfatázou po opätovnom premytí sa pridá 1,4-diamínobenzén, alebo 4-nitrofenylfosfát, reakcia sa zastaví po 30 až 40 min s 1 až 1,01 mól.l⁻¹ roztokom kyseliny sírovej a sfarbenie sa vyhodnotí vizuálne alebo fotometricky.