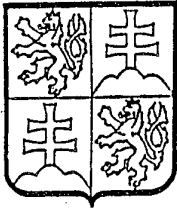


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)

PATENTOVÝ SPIS

277 024



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

(21) Číslo přihlášky : 1738-89
(22) Přihlášeno : 21.03.89
(30) Prioritní data :

(40) Zveřejněno : 17.06.92
(47) Uděleno : 30.09.92
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18.11.92

(13) Druh dokumentu : B6
(51) Int. Cl.⁵ :
G 01 N 33/558
G 01 N 33/531

(73) Majitel patentu : Lukeš Štěpán ing.CSc., České Budějovice, CS;
Prokopič Jan čl.koresp. ČSAV, České Budějovice, CS

(72) Původce vynálezu : Lukeš Štěpán ing.CSc., České Budějovice, CS;
Prokopič Jan čl. koresp. ČSAV, České Budějovice, CS

(54) Název vynálezu : Indikační prostředek pro průkaz protilátek
proti Fasciola hepatica u skotu

(57) Anotace :

Řešení se týká prostředku sestávajícího z indikačního materiálu ve tvaru pásku na bázi nitrocelulózové membrány nanesené na plastovém podkladu, přičemž na indikačním pásku jsou nanášeny tři oddělené kapky roztoku antigenu o objemu 2 µg/ml ředidla ve třech koncentracích 150, 100 a 50 µg antigenu/ml ředidla a zbývající plocha membrány je pokryta blokovací vrstvou nereaktivního proteinu např. želatinou. Prostředku je použito v testu, při kterém dochází k reakci antigenu s protilátkou ve vzorku a vzniklý imunokomplex je poté zviditelněn reakcí s antidruhově specifickým imunoglobulinem značeným peroxidázou, přičemž pozitivní reakce prokazující přítomnost protilátek ve vzorku je indikována změnou zbarvení podložního materiálu z bílé barvy do modré.

Vynález se týká indikačního prostředku pro průkaz protilátek proti *Fasciola hepatica* u skotu.

Sérologické zjištění většiny parazitárních onemocnění je nezastupitelné tam, kde je diagnóza přímým průkazem nemožná nebo málo pravděpodobná, tj. u helmintoz tkáňových a těch, kde prepatentní perioda je dlouhá, nebo hrozí nebezpečí závažného poškození hostitele již během tohoto období.

Ve veterinární i humánní medicíně je možno mezi takové helmintární onemocnění počítat i fasciolozu, protože, jak ukazují zkušenosti, koproskopie není vždy spolehlivá a samo období do objevení prvních vajíček v trusu hostitele je poměrně dlouhé cca 42 až 56 dnů /Sinclair, K. B. Helmit. Abstr. 36: 115 až 134, 1967; de Leon, D. et al. J. Parasitol. 67: 734 až 735, 1981/. Vajíčka ve většině případů je možno pravidelně prokazovat až po 3 až 4 měsíční invazi oproti protilátkám, které je možno v experimentu prokázat již po 3 až 5 týdnech. Terapeutický zásah je veden již v období rozvinuté patogeneze a často již není hostitel schopen vzniklé škody regenerovat.

Fasciolozu skotu a ovcí představuje trvale potenciální zdroj nebezpečí pro chov skotu a ovcí, jak potvrzují zkušenosti z řady vyspělých i rozvojových zemí. /Malone: Vet. Clin. N. Amer., 2: 262 až 275, 1986; Bundy et al: Paho Bull. 17: 243 až 258, 1983/. V ČSFR v některých chovech skotu je stále zamořeno cca 0,7 až 1,0 % stavu a 8,5 až 12,1 % farem; je nutno léčit 60 500 kusů skotu ročně, což představuje ztrátu na nákladech na anthelmintika 750 až 1 300 tisíc Kčs ročně. Ztráty na přírůstcích, mléce, konfiskací apod. se vyčíslují cca na 1 300 Kčs na jedno nakažené zvíře. Stav rozšíření u ovcí je podobný jako u skotu co do expensivity a hlavních lokalit.

Vzhledem k zoonotickému charakteru onemocnění u člověka má diagnostika i v humánní medicíně velký praktický význam /Hilleyer, G. V.: Fasciolosis, In.: Immunology of Parasitic Diseases, vol. 1. Walls, Schantz eds., s. 39 až 68, 1986/. Klasické sérologické testy jsou náročné na přípravu a provedení, obtížně standardizovatelné a málo pohotové. V poslední době je rozpracováván téměř výlučně imunienzymatický test "ELISA". /Boulard et al. Ann. Rech. Vet., 16: 363 až 368, 1985/. Zásadní překážkou v aplikaci tohoto vysoce citlivého a efektivního sérologického testu je výskyt častých nespecifických nebo zkřížených reakcí, které v mnoha případech zcela znemožní interpretaci výsledků testu pro klinickou praxi.

V práci o experimentální fasciolozě u ovcí byla použita nitroceluloza jako transportní medium pro vnášení antigenu do jamek destičky pro jinak klasický postup "ELISA" metodiky. /Zimmerman et al.: J. Vet. Res. 46: 1513 až 1515, 1985/. Stejná technika byla použita např. i toxocariozu u psů /Matsumura et al.: Zbl. Bakt. Hyg. A., 266: 580 až 585, 1987/. Další nevýhodou těchto testů je nutnost použití destiček s jamkami závislých na promývačích, vícekanálových pipetách a na vyhodnocovacím zařízení.

Předmětem vynálezu je indikační prostředek pro průkaz protilátek *Fasciola hepatica* u skotu, jehož podstatou je, že sestává

z indikačního pásku vytvořeného z nitrocelulozové membrány fixované na plastovém podkladu, na kterou jsou naneseny tři kapky roztoku antigenu o objemu 2 μ l, ve třech koncentracích 150, 100 a 50 μ g antigenu/ml ředidla, přičemž zbývající plocha membrány je pokryta blokovací vrstvou nereaktivního proteinu vybraného ze skupiny zahrnující želatínu, koňské sérum a bovinní sérový albumin.

Způsob použití tohoto prostředku je založen na principu, při kterém se prostředek s naneseným antigenem uvede do styku s testovaným vzorkem, který se poté nechá inkubovat, načež se vzniklý imunokomplex zviditelní reakcí s antibovinním imunoglobulinem značeným peroxidázou, přičemž pozitivní reakce prokazující přítomnost protilátek ve vzorku, se indikuje změnou zabarvení podložního materiálu produkty reakce peroxidázy se substrátem.

Za specificky pozitivní reakce se přitom považuje změna zbarvení u dvou nižších koncentrací antigenu a nespecificky pozitivní se hodnotí zbarvení nejvyšší koncentrace antigenu.

Výhodou prostředku podle vynálezu je zejména:

- 1/ Test je prováděn s jedním ředěním séra na jednom pásku
- 2/ Hranice průkazu je dána použitím tří rozdílných koncentrací antigenu, z nichž se reakce dvou a více hodnotí jako pozitivní reakce, jedné jako negativní nespecifický výsledek /vnitřní kontrola reaktivity systému/
- 3/ Test nevyžaduje žádné speciální zařízení
- 4/ Indikační pásek je dlouhodobě skladovatelný a trvale připravený k použití.

Příklad

Příprava prostředku pro průkaz protilátek proti Fasciola hepatica ve formě proužků

Na matnou stranu pásku nitrocelulozy /filtr SYNPOR 0,45 μ m/ byla nanesena mikrostríkačkou 2 μ l skvrna antigenu ve třech koncentracích, a to 150, 100 a 50 μ g antigenu v 1 ml ředidla /pufrovaný fyziologický roztok pH 7,2 s přídavkem 0,05 % hmot. Tween 20, dále jen PBS-T20/.

Pásek byl ponechán 30 minut v pokojové teplotě a poté vyprán v PBS-T20 10 minut a blokován v PBS-T20 s 10 % hmot. normálního koňského séra /dále jen PBS-720-NKS/.

Poté byl opláchnut v PBS-T20 a nechán zaschnout na filtračním papíře. Pro pozdější použití je pásek uložen zavařený do PVC sáčku v pokojové nebo chladničkové teplotě minimálně 1 týden, lépe 1 měsíc. Při použití prostředku podle vynálezu byl proužek rehydratován v PBS-T20 10 minut dále inkubován ve vzorku séra 1:1000 v PBS-T20-NKS jednu hodinu na třepačce a poté 3x 5 minut prán v PBS-T20. Po inkubaci v antibovinním konjugátu 1:1000 /nebo jiné vhodné koncentraci podle jeho kvality/ jednu hodinu, byl pásek prán 3x 5 minut v PBS-T20, inkubován cca 30 minut v substrátovém roztoku 4-chloro-1-naftolu v TRIS-/hydroxymethyl/-aminomethan-HCL pufrovaném pH 7,6 a reakce byla zastavena po zabarvení

první skvrny pomocí 0,5 % hmot. azidu sodného ve vodě a dobře vyprán vodou. Jako pozitivní výsledek je hodnocena modrá reakce dvou skvrn s nižší koncentrací antigenu.

Bylo provedeno ověření účinnosti na souboru 30 sér skotu pozitivního pitevně na fasciolozu a 30 sér skotu pitevně negativního na toto onemocnění.

Z 30 sér nemocných zvířat reagovalo pozitivně 25, tj. 83,3 %. Ze sér zdravých zvířat reagovala pozitivně 4 séra, což představuje specifčnost 86 %. Celkově bylo dosaženo 85 % správných výsledků, což je u zvířat dostatečná přesnost.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Indikační prostředek pro průkaz protilátek proti *Fasciola hepatica* u skotu, vyznačený tím, že sestává z indikačního pásku vytvořeného z nitrocelulóзовé membrány fixované na plastovém podkladu, na kterou jsou nanесeny tři oddělené kapky roztoku antigenu o objemu 2 μ l, ve třech koncentracích 150, 100 a 50 μ g antigenu/ml ředidla, přičemž zbývající plocha membrány je pokryta blokovací vrstvou nereaktivního proteinu vybraného ze skupiny zahrnující želatinu, koňské sérum a bovinní sérový albumin.

Konec dokumentu
