

FEDERÁLNÝ ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENIU

272 743

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵

G 01 N 33/549

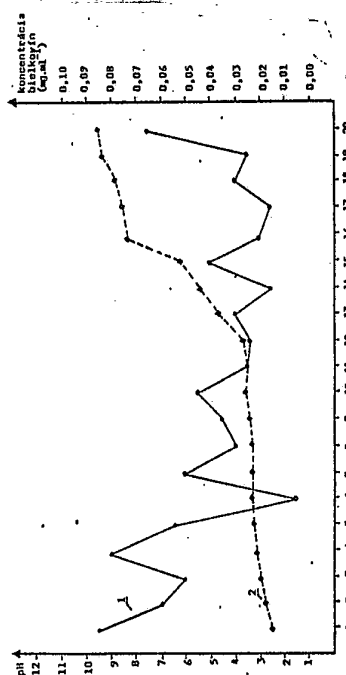
(21) PV 3267-88.T
(22) Prihlášené 16 05 88

(40) Zverejnené 13 06 90
(45) Vydané 25 11 91

(75) Autor vynálezu JURČINA ALFONZ doc. MVDr. CSc.,
LEŠNÍK FRANTIŠEK doc. MVDr. DrSc.,
BÁLENT PAVOL MVDr. CSc., KOŠICE

(54) Spôsob prípravy antigénu pre imunodifúznú diagnostiku leukózy hydiny

(57) Riešenie sa týka spôsobu prípravy antigénu pre imunodifúznú diagnostiku leukózy hydiny. Ako zdroj pre prípravu antigénu sa použil vírus z krvnej plazmy kŕčiat infikovaných vírusom myeloblastózy. Vlastná príprava antigénu spočíva v precipitácii polyetylén glykolom, solubilizácii p-Isooctylphanoxy-polyethoxy-ethanolom a voľnej izoelektrickej fokusácii. Získaný antigén je v podstate skupinovo-špecifický gs antigén spoločný pre všetky vírusové podskupiny leukózných vírusov hydiny. Možnosť využitia tohto spôsobu prípravy je pri všetkých vírusových antigénoch glykoproteínovej povahy, ako sú napr. glykoproteínové antigény vírusu bovinnej leukózy.



Vynález rieši progresívny spôsob prípravy antigénu na diagnostiku leukózy hydiny.

V súčasnosti diagnóza leukózy hydiny sa určuje predovšetkým na základe patologicko-morfologického vyšetrenia uhynutej hydiny. Dostupné vyšetrovacie metódy ako je napr. COFAL - komplement fixačný test pre leukózu hydiny a RIF - faktor indikujúci rezistenciu sú veľmi náročné a nákladné. Prípravou diagnostickej súpravy bolo by možné previesť rýchlu plošnú diagnostiku tohto ochorenia spôsobeného leukóznymi vírusmi. Zatiaľ u nás na diagnostiku leukózy hydiny sa komerčne nevyrába žiadny antigén.

K diagnostike leukózy hydiny Fraňo a kol. (1983) používali antigén pripravený z niektorých orgánov napr. z pečene, sleziny, srdca a jednak z vaječného bielka zo zamoorených chovov. Korec a kol. (1984) vyvinuli a preverovali metódu detekcie leukózneho vírusu v perových folikuloch sliepok. Uvedené pokusy o diagnostiku leukózy hydiny vrátane spôsobu prípravy antigénu boli len experimentálne a bez širokého zavedenia do praxe.

Podstata prípravy antigénu pre sérologickú diagnostiku leukózy hydiny spočíva v tom, že vírus z krvnej plazmy kurčiat infikovaných vírusom myeloblastózy sa precipituje 8% obj. roztokom polyetylén glykolu pri 4 °C; vzniklý precipitát sa oddelí od supernatantu centrifugáciou; potom sa solubilizuje 1% obj. roztokom p-Isocetylphenoxypolyethanolu 1 hodinu pri 37 °C a frakcionizuje izoelektrickou fokusáciou. Získaný antigén je skupinovo-špecifický gs antigén spoločný pre všetky podskupiny leukózných vírusov hydiny.

Prednosťou uvedeného spôsobu prípravy antigénu je možnosť sledovať replikáciu vírusu myeloblastózy na základe zvýšenia hematokrytu. Zvyšuje sa počet leukocytov a väčšinu cirkulujúcej krvi až 75 % tvoria myeloblasty. Zavedením sérologickej diagnostiky pomocou skupinovo-špecifického gs antigénu sa získa rýchly prehľad o epizootologickej situácii leukózy hydiny a následne sa dosiahne zníženie incidencie leukózy hydiny formou eradikácie pozitívnych reagentov.

Príklad zavedenia spôsobu prípravy antigénu.

Jednodňové kurčatá; chovná línia Hybro; boli infikované vírusom myeloblastózy i.v. dávkou 0,1 ml. Na 14. deň boli kurčatá vykrvené. Získaná heparinizovaná plazma bola precipitovaná pomocou 8% obj. roztoku polyetylén glykolu o molekulovej hmotnosti 6 000 pri 20 až 22 °C. Precipitát po 24 hodinách stáť pri 4 °C bol centrifugovaný pri 3 500 g/15 min. Sediment bol resuspendovaný v pufrovanom fyziologickom roztoku o pH 7,2 pri 4 °C a následne bola solubilizovaná 1% obj. roztoku p-Isocetylphenoxypolyethoxyethanolu $C_{34}H_{64}O_{11}$ o molekulovej hmotnosti 646,86 1 hodinu pri 37 °C. Po solubilizácii sa materiál centrifugoval pri 3 000 g/30 min pri 4 °C a resuspendoval do pôvodného objemu v pufrovanom fyziologickom roztoku po dobu 48 hodín. Kvantitatívne stanovenie vírusového antigénu bolo vykonané pomocou králičieho IgG anti gs. V prípade pozitIVITY solubilného roztoku v imunodifúznom teste, tento bol frakcionizovaný pomocou izoelektrickej fokusácie; pri vodiivosti 200 až 800 uS. Vzorka po fokusácii, ktorá trvala 48 hodín pri 4 °C a napätí 3 mA bola detekovaná na 20 frakciách.

Na výkrese je graficky znázornená závislosť jednotlivých frakcií a na osi y vľavo namerané hodnoty pH a vpravo koncentrácia bielkovín v $mg \cdot ml^{-1}$ jednotlivých frakcií. Krivka 1 znázorňuje koncentráciu bielkovín a krivka 2 znázorňuje pH jednotlivých frakcií. Všetky frakcie boli otestované voči pozitívnemu skupinovo-špecifickému séru. Pozitívne sérologickú reakciu dávala frakcia 16 s izoelektrickým bodom pI 8,3, ktorá predstavuje antigén pre imunodifúznú diagnostiku leukózy hydiny. Koncentrácia nukleoproteínov bola zisťovaná Kalckarovou metódou (Leggett, J.B.: Ultraviolet absorption of proteins Techniques in protein chemistry. Elsevier publ. Comp., Amsterdam 1967; s. 342-346) a pri popisovanom konkrétnom príklade boli dosiahnuté hodnoty uvedené v tabuľke.

Tabuľka

Fracia č.	E ₂₈₀	E ₂₆₀	$\bar{x}$
1	-	-	
2	-	-	
3	-	-	
4	0,280	0,350	0,147
5	0,215	0,300	0,089
6	0,210	0,305	0,078
7	0,170	0,280	0,039
8	0,170	0,270	0,046
9	0,105	0,225	0,014
10	0,105	0,225	0,014
11	0,100	0,235	0,028
12	0,115	0,260	0,025
13	0,230	0,410	0,030
14	0,230	0,370	0,056
15	0,215	0,375	0,034
16	0,250	0,395	0,070
17	0,220	0,395	0,026
18	0,220	0,390	0,030
19	0,235	0,410	0,037
20	0,200	0,340	0,038

P R E D M E T V Y N A L E Z U

Spôsob prípravy antigénu pre imunodifúziu diagnostiku leukózy hydiny vyznačujúci sa tým, že vírus z krvnej plazmy kurčiat, infikovaných vírusom myeloblastózy sa precipituje 8% obj. roztokom polyetylén glykolu pri 4 °C, vzniklý precipitát sa oddelí od supernatantu centrifugáciou, potom sa solubilizuje 1% obj. roztokom p-Isooctylphenoxypolyethoxyethanolu 1 hodinu pri 37 °C a frakcionizuje izoelektrickou fokusáciou.

1 výkres

CS 272 743 B1

