



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENIU

272 959

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
A 61 K 39/42

(21) PV 9712-86.E

(22) Prihlášené 22 12 86

(40) Zverejnené 12 07 90

(45) Vydané 20 12 91

(75) Autor vynálezu

POSPÍŠILOVÁ DARINA MVDr.,
SALAJ JURAJ MVDr. CSc.,
ŽUFFA TOMÁŠ MVDr., NITRA

(54)

Spôsob prípravy médiového antigénu na diagnostiku Markovej choroby hydiny precipitačným testom

(57)

Antigén sa pripravuje v primárnych alebo sekundárnych bunkových kultúrach z kuracích alebo kačacích embryí. Kultúry sú infikované apatogénnym vírusom Markovej choroby, kmeň MDV-KOL-A BN-MDV-06-1985, adaptovaným na bunkové kultúry. Vírus bol izolovaný z chovu hydiny bez zjavných klinických príznakov ochorenia. Pomnožuje sa v kultúrach buniek narastených na skle, plastickej hmote, kultivovaných štačionárnym spôsobom alebo v otáčaných fľašiach prípadne v suspenzii na mikronosičoch. Po pomnožení vírusu sa kultivačné médium zleje, vyčíri a antigén sa z média oddelí precipitáciou síranom amónnym. Precipitovaný antigén sa zahustí centrifugáciou. Sírany sa odstránia dialýzou a koncentrácia antigénu sa upraví tak, aby dosiahla 25 až 100násobok pôvodného objemu. Uchováva sa v zmrazenom alebo lyofilizovanom stave.

Vynález sa týka spôsobu prípravy médiového antigénu na diagnostiku Markovej choroby hydiny precipitačným testom.

Markova choroba hydiny je vírusové lymfoproliferatívne ochorenie kury domácej, charakterizované výskytom nádorov vo viscerálnych orgánoch, svalovine, koži, ďalej lymfoidnými infiltráciami v periférnych nervoch a vysokou mortalitou, ktorá niekedy dosahuje až 60 %, najčastejšie 10 až 20 %.

Kultivačné médium a bunky z kultúr infikovaných vírusom Markovej choroby obsahujú špecifické antigény označené A, B, C, dokázateľné precipitačným testom v agarovom géli. V kultivačnom médiu je prítomný najmä A antigén, ktorý sa používa na dôkaz precipitačných protilátok proti vírusu Markovej choroby v krvi, ako následok prítomnosti infekcie v chove. Okrem toho sa A antigén tvorí aj v bunkách epitelu perových folikulov kurčiat infikovaných vírusom Markovej choroby. Na prípravu A antigénu pre diagnostické účely sa využívajú najčastejšie dva spôsoby s použitím virulentného vírusu Markovej choroby:

1. Antigén sa získava z kultivačného média bunkových kultúr infikovaných virulentným vírusom Markovej choroby.

2. Na prípravu antigénu sa používajú koncové časti peria alebo koža zvierat infikovaných virulentným vírusom Markovej choroby.

Uvedené postupy majú nasledovné nevýhody. Pri prvom spôsobe prípravy virulentný vírus pasážovaním v bunkových kultúrach mení svoje vlastnosti tak, že postupne stráca schopnosť tvorby A antigénu. Pri získavaní antigénu z kože infikovaných zvierat - tieto sú trvalým zdrojom nákazy šírením infekcie do prostredia - čo je nežiadúce z hľadiska tlmenia ochorenia v populácii kury domácej. Okrem toho, antigén pripravený z kože obsahuje mnoho nedefinovaných zložiek a vyžaduje ďalšie čistenie.

Podľa navrhovaného postupu médiový antigén sa pripravuje v bunkových kultúrach z kuracích alebo kačacích embryonálnych buniek infikovaných apatogénnym vírusom Markovej choroby označeným MDV-KOL-A, uloženým v zbierke výrobných kmeňov národného podniku Bioveta v Nitre pod číslom BN-MDV-06-1985. Uvedený vírus bol izolovaný z chovu hydiny bez zjavných klinických príznakov ochorenia. V bunkových kultúrach sa veľmi dobre množí bez predchádzajúcej adaptácie. Tvorba antigénu do kultivačného média je stabilná aj po prekonaní 25 sériových pasáží. Spôsob prípravy médiového antigénu na diagnostiku Markovej choroby hydiny je založený na tom, že kmeň MDV-KOL-A vírusu Markovej choroby, ktorý je neškodný pre kuru domácu, sa pomnožuje na primárnych alebo sekundárnych kultúrach kuracích alebo kačacích embryonálnych buniek narastených na skle, plastickej hmote, kultivovaných štacionárnym spôsobom alebo v otáčaných fľašiach, prípadne na mikronosičoch. Na kultiváciu buniek pre produkciu médiového antigénu sa použijú vhodné živné médiá obohatené o kultivačné sérum. Bunkové kultúry sa infikujú vírusom Markovej choroby, ktorý je viazaný na živé bunky. To znamená, že inokulum predstavuje suspenzia živých buniek, ktoré obsahujú pomnožený produkčný vírus. Infikujú sa 24 až 48hodinové kultúry buniek narastené na kultivačnom povrchu tak, že suspenzia infikovaných buniek sa pridá do rastového média. Rovnako je možné suspenziu infikovaných buniek pridať do suspenzie buniek v rastovom médiu a súčasne naliať do kultivačnej nádoby. Vírus sa pomnožuje v bunkovej kultúre a v jednovrstve buniek vyvoláva viditeľné zmeny - rozpad buniek. Tieto zmeny ak postihnú viac ako polovicu buniek, kultivačné médium sa zleje a vyčíri nízkoobrátkovou centrifugáciou. Antigén sa pripraví vyzrážaním po pridaní kryštalického síranu amónneho do média pri chladničovej teplote. Precipitát sa zahustí nízkoobrátkovou centrifugáciou a následne dialyzuje proti fosforečnanmi tlmenému fyziologickému roztoku chloridu sodného. Získaný antigén po dialýze sa upraví tak, aby výsledná koncentrácia dosiahla 25 až 100násobok pôvodného objemu. Antigén sa skladuje pri teplotách nižších ako 0 °C krátkodobu, ale je možné ho aj lyofilizovať po rozplnení do ampuliek.

Výhodou uvedeného postupu prípravy médiového antigénu je, že sa používa namiesto virulentného prirodzene apatogénny vírus Markovej choroby, ktorý aj po sériovom pasážo-

vaní v bunkových kultúrach si zachováva schopnosť produkcie médiového antigénu. Ďalej, že na prípravu antigénu nie je potrebné používať živé zvieratá infikované virulentným vírusom Markovej choroby, ktoré sú potom trvalým zdrojom infekcie pre spoluumiestnené vnímavé zvieratá, čo má význam najmä z hľadiska tlmenia nákazy. Príprava antigénu z kože a z koncových častí peria je síce nenáročná, ale jednoduchým postupom sa nedosiahne taká čistota antigénu ako pri príprave z bunkových kultúr.

Uvedené príklady predmet vynálezu nijako neobmedzujú, ani nevyčerpávajú:

1. Spôsob kultivácie:

Suspensia buniek, pripravená pomocou proteolytických fermentov z lldňových kura-cích resp. l3dňových kačacích zárodkov v rastovom médiu s definovaným množstvom solí, aminokyselín a vitamínov s prídavkom 5 % hmot séra určeného pre tkanivové kultúry sa kultivuje na skle, plastickej hmote, štacionárnym spôsobom alebo v otáčaných fľašiach, prípadne v suspenzii na mikronosičoch.

2. Spôsob infekcie bunkových kultúr produkčným vírusom:

Inokulum predstavuje suspenzia živých buniek infikovaných produkčným vírusom, ktoré sa pridávajú do kultivačnej nádoby s bunkami v pomere 1:3 až 1:6 (suspensia buniek z jednej kultivačnej nádoby sa pridáva do 3 až 6 nádob s bunkami). Bunkové kultúry pripravené a pestované podľa bodu 1 sa infikujú produkčným vírusom nasledovnými spôsobmi:

a. Infekcia narastenej jednovrstvy buniek:

Do rastového média 24 až 48hodinovej kultúry buniek sa pridá inokulum a bunkové kultúry sa ďalej inkubujú bez výmeny média pri teplote 38 °C počas 72 až 120 hodín.

b. Bunková suspenzia v rastovom médiu s hustotou asi $10^7 \cdot \text{ml}^{-1}$ buniek sa zmieša s inokulom buniek infikovaných produkčným vírusom a súčasne vleje do kultivačnej nádoby. Kultivácia sa robí pri 38 °C počas 72 až 120 hodín.

3. Zber média, ktoré obsahuje antigén:

24 prípadne 48 hodín po infekcii je možné pôvodné rastové médium vymeniť za médium rovnakého zloženia, ale so zníženým obsahom (0,5 až 1,0 % hmot.) kultivačného séra. Vírus sa pomnožuje v bunkovej kultúre tak, že dochádza počas 72 až 120 hodín k rozsiahlemu rozpadu buniek a tým k uvoľňovaniu A antigénu do média. Ak zmeny postihujú viac ako 50 % jednovrstvy buniek, médium sa zleje a egalizuje zo všetkých kultivačných nádob.

4. Izolácia médiového antigénu:

Egalizované médium sa vyčíri nízkoobrátkovou centrifugáciou. Vyčírené médium sa zleje a za stáleho miešania sa pridáva kryštalický síran amónny v množstve 30 g na 100 ml média. Miešanie pri laboratórnej teplote sa robí až do rozpustenia celého množstva síranu. Precipitácia antigénu z média potom ďalej pokračuje pri teplote 2 až 8 °C počas 24 až 72 hodín. Precipitát od média sa oddelí nízkoobrátkovou centrifugáciou a dialýzou sa zbaví síranov. Dialýza proti fosforečnanmi tlmenému fyziologickému roztoku chloridu sodného sa robí tak, že precipitát sa nerozpúšťa, ale priamo vkladá do dialyzačnej hadice, čím sa dosiahne po dialýze dostatočná koncentrácia - 25 až 100násobok pôvodného objemu. Ďalšiu koncentráciu je možné dosiahnuť lyofilizáciou s tým, že lyofilizát sa rozpúšťa v menšom množstve destilovanej vody, ako bolo pôvodné množstvo antigénu pred lyofilizáciou.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Spôsob prípravy médiového antigénu na diagnostiku Markovej choroby hydiny precipitačným testom, vyznačujúci sa tým, že apatogénny vírus Markovej choroby kmen MDV-KOL-A uložený ve zbierke výv. kmenů n. p. Bioveta Nitra pod č. BN-MDV-06-1985, adaptovaný na bunkové kultúry sa pomnožuje na primárnych alebo sekundárnych bunkových kultúrach pripravených z kuracích alebo kačacích embryí v rastovom médiu s definovaným množstvom solí, aminokyselín a vitamínov obohatenom o bovinné sérum v množstve 0,5 až 10 % hmot, pri teplote 37 až 39 °C po dobu 72 až 120 hodín, médium s antigénom sa zleje, vyčíri centrifugáciou a precipituje síranom amónnym, dialyzuje a uchováva v tekutom alebo lyofilizovanom stave.
2. Spôsob podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že na prípravu sa použijú bunky z 10 až 11-dňových kuracích alebo 12 až 13-dňových kačacích embryí, narastených na skle, plastickej hmote, kultivovaných štacionárnym spôsobom alebo v otáčaných fľašiach prípadne v suspenzii na mikronosičoch.
3. Spôsob podľa bodov 1 a 2, vyznačujúci sa tým, že do produkčných bunkových kultúr sa inokuluje suspenzia živých buniek infikovaných produkčným vírusovým kmeňom, ktorá sa pridáva v pomere 1:3 až 1:6 do rastového média v kultivačnej nádobe s narastenými bunkami, alebo suspenzia neinfikovaných buniek v rastovom médiu s hustotou 400 000 až 800 000 v jednom mililitri sa zmieša so suspenziou infikovaných buniek a vleje do kultivačnej nádoby.
4. Spôsob podľa bodov 1 až 3, vyznačujúci sa tým, že za 24 až 48 hodín po infekcii sa rastové médium vymení za médium rovnakého zloženia, ale so zníženým obsahom bovinného séra na 0,5 až 1,0 % hmot.
5. Spôsob podľa bodov 1 až 4, vyznačujúci sa tým, že médium s antigénom sa vyčíri nízkoobrátkovou centrifugáciou a za stáleho miešania pri laboratórnej teplote sa pridáva kryštalický síran amónny v množstve 30 g na 100 ml, po jeho rozpustení precipitácia antigénu pokračuje pri teplote 2 až 8 °C počas 24 až 72 hodín, precipitát od média sa oddelí nízkoobrátkovou centrifugáciou, dialyzuje proti fosforečnanmi tlmenému fyziologickému roztoku chloridu sodného; uchováva sa v zmrazenom alebo lyofilizovanom stave.