



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

201 347

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 02 10 78

(21) PV 6345-78

(51) Int. Cl.³

G 01 N 33/96

// A 61 K 35/16

A 61 K 39/10

(40) Zverejnené 29 02 80

(45) Vydané 01 03 83

(75)

Autor vynálezu

HAJDU ŠTEFAN MVDr. CSc., NITRA

(54) Výroba monošpecifických precipitačných sér pre diagnostické účely

1

Vynález sa týka výroby monošpecifických precipitačných sér pre diagnostické účely, v ktorom sa rieši spôsob izolácie imunoglobulínových tŕied špecifickou imunoadsorpčnou metódou na príslušný bakteriálny korpuskulárny antigén a spôsob imunizácie pokusných zvierat použitých pre výrobu.

Rozbor doterajšieho stavu techniky ukazuje, že monošpecifické precipitačné séra obsahujú protilátky (precipitíny), ktoré sa špecificky viažu na príslušný druh bielkovín a po ich väzba sa vyprecipitujú v nerozpustnom komplexe. Precipitačné séra sa vyrábajú proti rôznym antigénom, hlavne proti jednotlivým bielkovinám krvného séra. Nakoľko uvedené séra precipitujú iba antigén, ktorý dal podnet k ich tvorbe, sú vhodné na kvalitatívny a kvantitatívny dôkaz príslušného antigénu v rôznych telových tekutinách za použitia imunochemických reakcií. Takýmito reakciami sú napríklad dvojsmerná imunodifúzna metódy podľa Ouchterlonyho, imunoelektroforéza, jednoduchá radiálna imunodifúzia a pod. Okrem toho sú tieto precipitačné séra základnou surovinou pri výrobe fluorescenčných sér pre priamu a nepriamu fluorescenciu.

Metódy, v ktorých sa používajú monošpecifické precipitačné séra, patria k novším pokrokovým imunodiagnostickým metódam, dnes už nepostrádateľným, či už vo výskume alebo v bežnej veterinárnej imunodiagnostike. Veľký teoretický a praktický význam má kvalitatívny a kvantitatívny dôkaz imunoglobulínov krvného séra. Pre výrobu monošpecifických precipitačných sér je

201 347

potrebné získať v prvom rade jednotlivé triedy imunoglobulínov (napr. IgG a IgM) v imunochemicky čistom stave. Na izoláciu a purifikáciu rôznych tried imunoglobulínov boli v poslednom desaťročí vyvinuté pomerne zložité fyzikálno-chemické metódy za použitia chemikálií a prístrojov poväčšine z dovozu z kapitalistických štátov. Nakoľko literatúra týkajúca sa uvedenej tématiky je veľmi rozsiahla a v podstate sa zakladá na rovnakých princípoch, uvádzam z nich niektoré používané pri izolácii imunoglobulínov IgG a IgM triedy.

S t e f f e n (Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunopathologie sowie ihre klinische Anwendung, - Georg Thieme Verlag - Stuttgart 1968, strana 564), používa pri izolácii IgM imunoglobulínu nasledovnú metodiku :

Do 10 ml krvného séra sa pridá 0,4 ml 10%-ho roztoku Dextránsulfátu rozpusteného v destilovanej vode a 1 ml 1 M roztoku CaCl_2 . Po zmiešaní sa roztok nechá 15 minút stáť pri izbovej teplote. Vyprecipitované lipoproteíny sa centrifugovaním odstránia (10 min. pri 6,000 g). Supernatant sa za krátku dobu dialyzuje proti destilovanej vode a potom sa doplní do 200 ml roztokom 0,75 %-nej kyseliny boritej. Po 30 min. stáťia pri izbovej teplote sa vzniklý precipitát odcentrifuguje (10 min. pri 2,000 g). Sediment sa ešte dvakrát premyje roztokom kyseliny boritej v uvedenej koncentrácii. Po premytí sa precipitát rozpustí v 3 až 4 ml pufru nasledovného zloženia: Tris-Hydroxymethylaminomethan 7,96 g, NaCl 58,45 g sa rozpustí v destilovanej vode s obsahom 0,033 M HCl (pH 8,0).

Týmto spôsobom rozpustený precipitát sa potom naniesie na kolonu naplnenú gelom Sephadex G-200 o rozmeroch 2,8 x 80 cm ustálenú na uvedený Tris pufo. Frakcie prvého vrcholu obsahujú čistý IgM imunoglobulín. Metóda však nevylučuje znečistenie alfa₂ makroglobulínom, ktorá sa nachádza takmer vo všetkých IgM imunoglobulínových preparátoch pripravených uvedenou metódou. Alfa₂ makroglobulína má totiž veľmi blízke fyzikálno-chemické vlastnosti ako IgM imunoglobulín.

F e y (Methods of Purification and Quantitation of bovine Immunoglobulins, Zbl.Vet.Med. B,23, 1976, 269-300) udáva nasledovnú metódu izolácie IgM imunoglobulínu :

Krvné sérum sa dialyzuje proti 0,01 M fosfátovému pufru o pH 5,4. Euglobulínový precipitát, ktorý vznikne pri dialýze sa dvakrát premyje v 0,01 M acetátovom pufru s obsahom 0,15 M NaCl o pH 5,4. sa rozpustí. Množstvo acetátového pufru má byť 20 % pôvodného množstva séra. Potom za stáleho miešania pri kvapkáva 0,1 M ZnSO_4 , aby výsledná koncentrácia ZnSO_4 dosiahla 25 mM. Vzniklý precipitát sa pri izbovej teplote mieša po dobu dvoch hodín a potom sa centrifugovaním odstráni pre 3000 ot/min. Používa sa supernatant, z ktorého sa Zn ióny odstránia pomocou 1%-ho roztoku tetrasódnej EDTA. Po koncentrovaní roztoku sa tento dá na gelovú kolónu naplnenú Sephadexom G-200 ustálenú na 0,1 M Tris-HCl pufo s obsahom 0,1 M NaCl o pH 8,6. Frakcie prvého vrcholu obsahujú IgM imunoglobulín. Pre imunizáciu zvierat sa však používajú len frakcie nachádzajúce sa v ascendentnej časti prvého vrcholu. Ale i takto pripravené precipitačné séra obsahujú precipitíny proti IgG a alfa₂M bielkovinám, ktoré treba z precipitačného séra odstrániť. Na odstránenie alfa₂M globulínu pripravil izolačnú metódu na získanie uvedeného globulínu v čistom stave. Týmto sa popísaná metóda ďalej komplikuje.

Na izoláciu IgG triedy imunoglobulínu používajú takmer všetci autori gélovú filtráciu (napríkl. Sephadex G-200) a iontomeniče (ako je DEAE celulóza a DEAE Sephadex). Pre tento účel sa používa buď celé krvné sérum alebo kolostrum, alebo z nich izolované imunoglobulíny v nečistom stave za použitia síranu amónneho, síranu sódného alebo rivanolu.

L e v i e u x (Immunoglobulines Bovines et Brucellose, Ann.Rech.Vétér., 1974, 5,329-342) udáva nasledovný postup izolácie IgG2 imunoglobulínu :

Celé sérum hovädzieho dobytku sa filtruje na Sephadex G-200 na kolone o rozmeroch 90x5 cm ustálenej na 0,1 M Tris-HCl pufoer s obsahom 0,15 M NaCl a Azidu sódného v celkovej koncentrácii 1:5000 o pH 8,0. Frakcie druhého vrcholu, ktoré obsahujú IgG imunoglobulín a ostatné bielkoviny s obdobnou molekulovou váhou ďalej frakcionuje na DEAE celulóze za použitia nasledovných pufov : 0 : 0,01 M pH 8,0 - 1 : 0,015 M pH 7,3 - 2 : 0,03 M pH 7,3 - 3:0,06 M pH 7,0 - 4:0,1 M pH 6,0. Používa fosfát pufoer. Roztok získaný pri gelovej filtrácii dialyzuje proti 0,01 M fosfát pufru a pri tejto molarite získané frakcie znovu dá na uvedený iontomenič a filtruje ich pri tej istej molarite. Takto získa čistý IgG2 imunoglobulín. Ostatní autori používajú viac alebo menej komplikované metódy v podstate zhodné a líšia sa iba v tom, že nevychádzajú pri frakcionovaní z celého séra, ale najprv izolujú IgG imunoglobulín v nečistom stave za použitia vymenovaných chemikálií, či už z krvného séra alebo z kolostra a takto získaný imunoglobulín frakcionujú na geloch, alebo na iontomeničoch.

Druhým predpokladom pre výrobu kvalitných monošpecifických precipitačných sér je voľba vhodného zvierata. Pre tento účel sa najčastejšie používajú králi, koza, osol a ošípaná. Dôležitým limitujúcim faktorom je aj imunizačný postup (miesto aplikácie, interval medzi jednotlivými aplikáciami antigénu, dávky antigénu, použitie alebo nepoužitie rôznych adjuvancií a pod.). Imunizačné postupy sú v literatúre uvádzané veľmi stručne, nakoľko sa jedná o komerčne vyrábané preparáty, ktorých presný výrobný postup je tajný. Spravidla sú imunizačné postupy zdĺhavé a nie vždy zaručujú precipitačné séra žiadanej kvality. Pre ilustráciu uvádzam imunizačný postup pri získavaní antiséra proti zvieraciemu gamaglobulínu. Autormi sú Semotán a kolektív. Záverečná správa „ Konjugáty „, Bioveta, Ivanovice na Hané 1974.

Prvý deň sa aplikuje 3 ml Freundovho adjuvans podkožne. Ďalej sa podáva intra vénam 1%-ný roztok gamaglobulínu po 1 ml na 9., 12., 15., 19., 21., 26., 30. a 33.deň. Na 36. deň sa podá znova 3 ml Freundovho adjuvans podkožne. Na 44., 47. a 50.deň sa znova podá intra vénam po 1 ml 2%-ho roztoku gamaglobulínu. Na 53.deň sa podáva opäť adjuvans v uvedenom množstve podkožne. Imunizačný postup sa ukončí intra venóznym podaním 3%-ho gamaglobulínu na 60., 63. a 66.deň.

Z uvedeného vyplýva, že pri izolácii jednotlivých tried imunoglobulínov sa používajú pomerne komplikované metódy za použitia drahých chemikálií a prístrojov, pričom nezaručia izoláciu bielkovín dostatočnej čistoty pre imunizáciu zvierat. Ďalej sa používajú zdĺhavé imunizačné postupy, ktoré nezaručia vždy výrobu precipitačných sér žiadanej kvality. Z uvedeného vyplýva, že výroba monošpecifických precipitačných sér si vyžaduje ďalšie zdokonalenie.

Podstata vynálezu spočíva v praktickom využití vlastných prác, výsledkov výskumu získaných pri zisťovaní dynamiky tvorby protilátok pri brucelóze hospodárskych zvierat, pri imunizácii, resp. priebehu infekčného procesu. Pri imunizácii zvierat v začiatočnom štádiu imunizačného procesu sú takmer všetky protilátky viazané výhradne na IgM triedu, v neskoršej fáze je protilátková aktivita viazaná na IgG triedu. Tak isto bolo zistené pri vlastných pokusoch, že brucelové protilátky viazané na IgM triedu sú relatívne termorezistentnejšie ako brucelové protilátky viazané na IgG triedu. Protilátky IgM triedy sa dokonale ničia 10 min. zahriatím na 70 °C, pričom protilátky IgG triedy sú takmer nenarušené. Tieto dva momenty som využil pri výrobe monošpecifických zvieračích anti-IgM a anti-IgG precipitačných sér. To znamená, že izoláciu IgM imunoglobulínov môžeme docieľiť imunoabsorbčnou metódou za použitia brucelového antigénu, ak použijeme brucelové pozitívne sérum od imunizačných zvierat na 5. až 6. deň od začiatku imunizácie. Na izoláciu imunoglobulínov IgG triedy však treba použiť krvné sérum od imunizačných zvierat, u ktorých uplynulo 14 až 15 dní od imunizácie, pričom sa protilátky viazané na IgM triedu odstránia inaktivovaním vo vodnom kúpeli pri 70 °C po dobu 10 minút. Protilátky viazané na povrch brucelového antigénu, teraz už ako antigén, slúžia na produkciu príslušného antiséra po aplikovaní vhodným pokusným zvieratám. Pritom sa zvolil taký imunizačný postup, aby malé množstvo imunoglobulínov viazané na povrch brucelového antigénu bolo dostatočné na výdatnú tvorbu protilátok. Treba podotknúť, že brucelové protilátky príslušnej triedy sú tak pevne chemicky viazané na receptoch brucelového korpuskulárneho antigénu, že ostatné sérové bielkoviny sa pri centrifugovaní (premytí) dokonale odstránia. Uvedené nedostatky za použitia popísaných vlastností brucelových IgG a IgM protilátok sa odstránia tak, že imunoglobulíny IgG a IgM triedy sú imunochemicky naviazané na povrch brucelového antigénu pri použití vhodných brucelových sér. Takto získané imunoglobulíny spolu s korpuskulárnym brucelovým antigénom sa použijú na imunizáciu králikov. Pritom je volený taký imunizačný postup, ktorý i pri nízkom množstve imunoglobulínov IgG a IgM triedy zaručí tvorbu a tým aj výrobu kvalitných monošpecifických precipitačných sér za relatívne krátku dobu.

Spôsob výroby monošpecifických precipitačných sér pre diagnostické účely vyznačuje sa tým, že na imunizáciu zvierat s výhodou králikov sa použije korpuskulárny bakteriálny antigén, s výhodou brucelový, pre pomalú aglutináciu špecificky imunoabsorpčne obsadený protilátkami rôznych tried imunoglobulínov, ktorý sa aplikuje dokonale premytý (aspoň 3 x) s výhodou vo fyziologickom roztoku chloridu sodného o koncentrácii 0,85 %, pri imunizačnom procese s výhodou s kompletným Freundovým adjuvansom subkutánne (medzi prsty predných a zadných končatín) a intramuskulárne, prípadne do žily bez adjuvansu.

P O P I S V Y N Á L E Z U

1. Príprava brucelového pozitívneho séra s obsadením IgG a IgM protilátok :

Veľkým zvieratám (hovädzí dobytok, kôň) sa na prvý a druhý deň intra vénom aplikuje 5 ml brucelového antigénu pre pomalú aglutináciu. Obdobný je imunizačný postup aj u men-

ších zvierat (ošipaná, ovca, koza) s tým rozdielom, že aplikujeme iba 2 ml antigénu. Krv sa odoberá najprv na 5. a 6.deň pre výrobu monošpecifických anti-IgM precipitačných sér a drhýkrát na 14.až 15.deň na výrobu anti-IgM precipitačných sér. Odoberatú krv necháme zraziť a centrifugáciou pri 2000 g po dobu 30 minút získame číre sérum. V prípade, že sa sérum ihneď nespracuje, konzervuje sa lyofilizovaním alebo zmrazením pri -20°C . Takto konzervované sérum je použiteľné pre uvedené účely po dobu 2, rokov.

2. Príprava brucelového antigénu senzibilizovaného protilátkami IgM a IgG triedy :

Výroba anti-IgM precipitačného séra :

Pre výrobu monošpecifického anti-IgM precipitačného séra sa použije pozitívne sérum od príslušného druhu, ktoré sme odobrali na 5.až 6.deň po prvej aplikácii antigénu. Sérum sa inaktivuje pri 60°C po dobu 30 min. vo vodnom kúpeli. Sérum sa vyšetrí na hladinu brucelových protilátok pomocou skúmavkovej aglutinácie podľa platných vyšetrovacích metód.

Aby sa docielilo čo najdokonalejšie obsadenie všetkých receptorov brucelového antigénu, použije sa 8 až 16 násobné množstvo brucelových protilátok, ktoré sú v pomalejšej aglutinácii schopné aglutinovať všetky brucely (aglutinácia na ++++). Na príklad, ak má sérum titer 160 znamená to, že jedna jednotka brucelového antigénu (0,05 ml) je aglutinovaná sérom v zriedení 1:160. V tomto prípade použijeme na jednu jednotku antigénu polovičné alebo rovnaké množstvo pozitívneho brucelového séra. Sérum sa v požadovanom pomere zmieša s brucelovým antigénom a inkubuje v termostate pri 37°C po dobu 4 až 8 h a potom cez noc v chladničke pri $+4$ až $+6^{\circ}\text{C}$. Antigen je plne obsadený protilátkami vtedy, ak supernatant antigénu po odcentrifugovaní ešte obsahuje brucelové protilátky, t.j. v rýchlej aglutinácii na sklíčku aglutinuje brucelový antigen. Ak to nie je tak, pridá sa ešte k brucelovému antigénu sérum a inkubácia sa prevedie rovnakým spôsobom ako predtým.

Brucelovými látkami obsadený antigen potom odcentrifugujeme po dobu 10 min. pri 2000-g a sediment 4x premyjeme vo fyziologickom roztoku NaCl v pôvodnom objeme. Po poslednom centrifugovaní sediment resuspendujeme v takom množstve fenol-fyziologickom roztoku (obsah fenolu 0,5%), aké množstvo antigénu sme pôvodne použili na senzibilizáciu. Antigen pomocou sterilných buličiek roztrepeme. Takto senzibilizovaný antigen uchovávaný pri teplote $+4$ až $+8^{\circ}\text{C}$ je použiteľný na imunizáciu králikov aspoň jeden rok.

Výroba anti-IgG precipitačného séra :

Na výrobu monošpecifického anti-IgG precipitačného séra sa použije krvné sérum odoberaté na 14.až 15.deň po imunizácii príslušného druhu zvierat. Sérum sa zriedi rovnakým dielom s 0,85 % roztokom NaCl a inaktivuje sa v ultratermostate po dobu 10 min. pri teplote 70°C . Pri takejto inaktivácii séra spravidla stratia aglutinačnú schopnosť alebo aglutináciu vyvolávajú zónove, t.j., že aglutinácia nevzniká tam, kde sa nachádza najväčšie množstvo protilátok, ale vo vyšších zariadeniach. Pri tejto inaktivácii sa IgM protilátky dokonale odstránili a zostali iba protilátky viazané na IgG triedu imunoglobulínov. Titer protilátok však meriteľne môžeme dokázať iba antiglobulínovou technikou podľa Coombsa vo vlastnej modifikácii.

201 347

Na senzibilizáciu antigénu použijeme 8 až 16 násobné množstvo protilátok na jednu jednotku antigénu (0,05 ml), ktoré je schopné vyvolať aglutináciu na ++++ v modifikovanom antiglobulínovom teste. Napríklad, ak má sérum titer 640, tak na 1 ml brucelového antigénu použijeme 2 alebo 4 ml brucelového séra inaktivovaného uvedeným spôsobom. Pri určení titra brucelových brucelových protilátok v modifikovanom antiglobulínovom teste nesmieme zabudnúť na to, že sa pracuje so zreideným sérom. Premytie antigénu sa robí obdobným spôsobom ako pri príprave senzibilizovaného antigénu IgM protilátkami s tým rozdielom, že ho centrifugujeme po dobu 30 minút pri 6000 g. Po poslednom premytí antigén resuspendujeme vo fyziologickom roztoku ako pri príprave IgM antigénu. Použitelnosť tohto antigénu je zhodná s predchádzajúcim.

3. Imunizácia králikov pre výrobu monošpecifických anti-IgG a anti-IgM precipitačných sér pre jednotlivé druhy zvierat :

Imunizačný postup je rovnaký pre obe triedy bez ohľadu na triedu imunoglobulínov. Na imunizáciu použijeme králiky vo váhe 4 až 6 kg. Prvá imunizácia králikov sa robí do kože medzi jednotlivými prstami predných a zadných nôh tak, že na dvoch miestach každej nohy aplikujeme po 0,25 ml antigénu. Antigén pre prvú a druhú imunizáciu sa pripraví s kompletným Freundovým adjuvansom tak, že na 1 ml brucelového senzibilizovaného antigénu (antigén sa musí dokonale premiešať, nakoľko stáť sedimentuje), pridáme 1 ml Freundovho adjuvansu a brucelovú suspenziu s adjuvansom zhomogenizujeme pomocou injekčnej striekačky. Asi desaťkrát sa obsah natiahne a energicky vystriekne zo striekačky. Pri prvej imunizácii pripadá na jedného králika objem dva ml (1 ml brucelového antigénu a 1 ml adjuvansu). Druhá imunizácia králikov sa robí na 14.deň intra-muskulárne do stehenného svalu rovnako pripraveným antigénom ako pri prvej imunizácii v dávke 1 ml. Tretíkrát sa aplikuje antigén bez adjuvansu na 21.deň do ušnej marginálnej žily v dávke 1 ml na králika a na 22.deň sa rovnako aplikuje ten istý antigén (bez adjuvansu) v dávke 1 ml na králika.

Králiky sa vykrvia na 5.deň po poslednej aplikácii antigénu a sérum sa získava tak, že krv sa nechá koagulovať. Po oddelení krvného koláča od steny centrifugačného pohára vloží sa do termostatu na 1 h. Potom sa krv centrifuguje po dobu 30 min pri 3000 g a číre s_{rum} sa stiahne injekčnou striekačkou.

Precipitačné séra sa vyšetrí imunoelektroforeticky proti celému krvnému séru, alebo východiskovej telnej tekutine príslušného druhu zdravého zvierata. Obdržíme iba jednu výraznú precipitačnú líniu charakteristickú pre danú triedu imunoglobulínu. Markantnejšie sú však rozdiely, keď sa precipitačné séra vyšetrí na precipitačnú aktivitu. Táto sa dokazuje jednoduchou radiálnou imunodifúznou metódou tak, že sa do gelu (agar alebo agaróza) inkorporuje príslušný antigén (imunoglobulín) a do dierok sa pridáva rovnaké množstvo vyrobených precipitačných sér. Precipitačné sérum je tým kvalitnejšie, čím vznikne väčší a výraznejší ostro ohraničený precipitačný kruh za ten istý čas. Touto metódou kontrolované precipitačné séra vyrobené podľa vynálezu, vykazujú až dva až päťkrát väčšiu precipitačnú aktivitu v porovnaní s inými metódami na výrobu precipitačných sér. Okrem toho nie je zanedba-

telná prednosť navrhovanej výroby aj to, že sa precipitačné séra vyrobia za kratšiu dobu a netreba použiť komplikované izolačné metódy na izoláciu a purifikáciu imunoglobulínov rôznych tried, aby sme ich dostali v imunochemicky čistom stave. Vyššia účinnosť (precipitačná aktivita) sa vysvetľuje tým, že pokusné zvieratá dosť zle tvoria protilátky (precipitíny) proti čistým imunoglobulínom, ale relatívne dobre tvoria protilátky proti nečistotám (iný druh bielkovín), ktoré môžu obsahovať, i keď v nepatrných množstvách. Po adsorpcii na bakteriálny „nosič“ však imunoglobulíny sa stanú pre pokusné zvieratá oveľa potentnejším antigénom, ktoré potom proti nim výhodnejšie tvoria precipitíny. Nedá sa však zanedbať ani potentujúci účinok samotného bakteriálneho nosiča, najmä obsahu polysacharidov na imunitný systém pokusného zvieratá. Tým sa dosiahne tvorba väčšieho množstva precipitínov za kratšiu dobu u imunizovaných zvierat, čo je podstatou vynálezu.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob výroby monošpecifických precipitačných sér pre diagnostické účely, vyznačujúci sa tým, že sa zvieratá, s výhodou králiky, imunizujú korpuskulárnym bakteriálnym antigénom, s výhodou brucelovým, pre pomalú aglutináciu, ktorý je špecificky imunoadsorbčne obsadený protilátkami rôznych tried imunoglobulínov, pričom uvedený antigén sa minimálne trikrát premyje fyziologickým roztokom chloridu sodného a pre prvú a druhú imunizáciu zvierat sa antigén zmieša kompletným Freundovým adjuvansom a aplikuje sa subkutánne medzi prsty predných a zadných končatín a intramuskulárne a pre tretiu imunizáciu sa aplikuje antigén bez adjuvans intravenózne a následne sa zvieratá vykrvia a sérum sa získa po koagulácii odstránením krvného koláča.