



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

223 461

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 14 05 81

(21) PV 3545-81

(51) Int. Cl.³ A 61 B 10/00

(40) Zverejnené 28 01 83

(45) Vydané 01 05 84

(75)

Autór vynálezu AITANER ČESTMÍR ing.CSc., BRATISLAVA
ZAJAC VLADIMÍR RNDr.CSc., BRATISLAVA

(54) Tyčinka pre diagnostiku leukémie a spôsob jej prípravy

Vynález sa týka tyčinky pre diagnostiku leukémie a iných onemocnení a spôsobu jej prípravy. Podstata vynálezu spočíva v tom, že tyčinka pre diagnostiku leukémie a iných onemocnení je vytvorená z umelej hmoty napríklad z polystyrénu a jej povrch je protiahnutý antigénom, napríklad dezintegrovaným materiálom vírusu bovinnej leukózy. Spôsob prípravy tyčinky sa vyznačuje tým, že na tyčinku z umelej hmoty sa naabsorbuje antigén pri teplote 4 až 37°C v priebehu 2 až 18 hodín a v druhom stupni sa povrch aktívnej časti tyčinky saturuje roztokom želatíny v pufrovacom roztoku pri pH 7,6. Vynález má použitie na stanovenie protilátok, antigénov, biologicky aktívnych látok v humánnej medicíne a na diagnostiku tuberkulózy, brucelózy, infekčnej anémie koní, moru priasat, atď.

Vynález sa týka tyčinky pre diagnostiku leukémie a iných onemocnení a spôsobu jej prípravy.

Leukóza hovädzieho dobytku sa šíri ako infekčná choroba v stádach. Chorobu spôsobuje vírus. Krátko po infekcii zvierat vírusom sa v sérach postihnutých zvierat vyskytujú protilátky proti tomuto vírusu. Táto skutočnosť je základom pre väčšinu včasných diagnostických metód bovinnej leukózy.

Doteraz sa diagnostikuje bovinná leukóza niekoľkými spôsobmi. Hematologicky sa zisťuje len pokročilý stav choroby, nie je to metóda včasnej diagnostiky [Černý L., Závada J., Altaner Č., Pravda D. a Volejníček: Veterinářství 28, 150-153, /1978/]. Další spôsob hojne užívaný je detekcia protilátok proti vírusu metódou imunoprecipitácie v agare. Tento spôsob je málo citlivý a dokazuje len zvieratá s vysokým obsahom protilátok [Mammerickx M., Portetelle D., Kettmann R., Chysdael J., Burny A., Dekagel D., Europ. J. Cancer 12, 433-439 /1976/]. Novšie spôsoby ako séroneutralizačný test využívajúci VSV (BLV) pseudotypy [Závada J., Černý L., Zavadová Z., Božoňová J. a Altstein A.D., J. Natl. Cancer Inst. 62, 95-101 /1976/] a rádioimunologické spôsoby detekcie protilátok v sére sú spôsoby vysoko citlivé a preto vhodné pre včasnú diagnostiku [Levy D., Deshayes L., Parodi A.L. a Levy J.P., Int. J. Cancer 25; 147-152 /1980/ a Zajac V., Altaner Č., Závada J., Černý L., Neoplasma 27; 517-523 /1980/]. Majú však niekoľko nevýhod. Séroneutralizačný test vyžaduje virologické laboratórium s možnosťou sterilnej práce, rádioimunologické metódy vyžadujú laboratória a pracovníkov oprávnených pracovať s rádioizotopmi a nákladné prístroje na meranie rádioaktivity.

Uvedené nevýhody odstraňuje tyčinka pre diagnostiku leukémie a iných onemocnení, ktorej podstata spočíva v tom, že je vytvorená z umelej hmoty, napríklad z polystyrénu a jej povrch je potiahnutý antigénom, napríklad dezintegrovaným materiálom vírusu bovinnej leukózy. Podstata spôsobu prípravy tyčinky pre diagnostiku leukémie a iných onemocnení spočíva v tom, že na tyčinku z umelej hmoty napr. polystyrénu, silikonovej gumy sa naadsorbuje v prvom stupni antigén pri teplote 4 až 37°C v priebehu 2 až 18 hodín a v druhom stupni sa povrch

aktívnej časti tyčinky saturuje roztokom želatiny v pufovom roztoku napríklad 0,02 M 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol-hydrochloride pri pH 7,6.

Výhoda vynálezu spočíva vo vysokej citlivosti a špecifčnosti a v možnosti spracovať veľké množstvo vzoriek. Nie sú potrebné žiadne nákladné prístroje, odstraňuje sa práca s rádioizotopmi, spôsob prípravy je ekonomicky nenáročný na materiál a dá sa prevádzať aj v terénnych podmienkach.

Tyčinky pre diagnostiku leukémie a iných onemocnení sú schopné špecificky viazať protilátky proti vírusu bovinnej leukózy vo vyšetrovaných sérach. Detekcia a vizualizácia týchto protilátok sa prevádza pomocou konjugátu antihovädzieho gamaglobulínu s peroxidázou. Diagnostická tyčinka v sére leukemickým vírusom infikovaných zvierat sa zafarbí na hnedo-červeno, zatiaľ čo v sére zdravých jedincov zostáva nezmenená.

Vynález má použitie nielen na stanovenie protilátok proti bovinnej leukóze, ale sa dá využiť na stanovenie protilátok, antigénov, biologicky aktívnych látok v humánnej medicíne napr. na diagnostiku hepatitídy B, A, najrozličnejších parazitárnych onemocnení, stanovení hormónov a vo veterinárnej medicíne napr. na diagnostiku tuberkulózy, brucelózy, infekčnej anémie koní, moru prasiat a pod. Aplikácia spočíva len v zámene antigénu či protilátky, ktorá je naadsorbovaná na diagnostickú tyčinku.

Príklad 1

Na tyčinku z umelej hmoty, výhodne z polystyrénu sa naviaže dezintegrovateľný materiál vírusu bovinnej leukózy pri 4°C počas 18 hodín.

Neobsadené adsorpčné skupiny sa potom saturujú 0,25% roztokom želatiny v 0,02 M pufrí 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol-hydrochloride pri pH 7,6.

Príklad 2

Na tyčinku z umelej hmoty sa naviaže bakteriálny antigén pri teplote 37°C po dobu 2 hodín. Neobsadené adsorpčné miesta sa saturujú 0,5% roztokom bovinného sérum albumínu

v 0,02 M pufrí 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol-hydrochloride pri pH 7,6.

Príklad 3

Ako zdroj vírusu slúžia bunky kultivované in vitro v tkanivových kultúrach, ktoré produkujú vírus bovinnej leukózy do média. Vírus z média sa koncentruje a purifikuje ultracentrifugáciou na sacharózových gradientoch.

Testované séra zvierat podozrivých z nákazy vírusom bovinnej leukózy sa nariaedia 1:10 s 0,2 M pufrí 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol-hydrochloride pri pH 7,0 s prídavkom zmáčadla (p-isooktylfenoxypolyepoxyetanol). Do takto nariadeného séra sa ponoria diagnostické tyčinky anechajú sa pri laboratórnej teplote 2 hodiny alebo 1 hodinu pri 37°C. Tyčinky sa opláchnu v 0,02 M pufrí 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol-hydrochlorid pri pH 7,0 s 0,05 % (p-isooktylfenoxypolyepoxyetanol) premývací pufer v troch premývacích krokoch po 1 minúte. Opláchnuté tyčinky sa ponoria do konjugátu antihovädzieho gamaglobulínu s peroxidázou, kde sa ponechajú 2 hodiny pri teplote miestnosti. Tyčinky sa znovu premývajú rovnakým spôsobom v premývacom pufrí a potom prenesú do roztoku chromogénneho substrátu, ktorý sa pripraví tak, že sa 2 mg 3-amino-9-etylkarbazolu v 1 ml dimetylformamidu a pridá sa 4 ml 5 mM acetátového pufru pH 5,0. Bezprostredne pred reakciou sa do roztoku pridá 15 ml 3 % peroxidu vodíka.

Vyvolávanie farebnej reakcie na povrchu diagnostickej tyčinky trvá 5 až 10 minút s možnosťou vizuálnej kontroly tyčiniek s kontrolným pozitívnym a negatívnym sérom. Reakcia sa zastaví buď opláchnutím tyčiniek vodou alebo prídanim 10 ml 1 % azidu sodného do reakčnej zmesi. Výsledok testu sa hodnotí vizuálne. Diagnostické tyčinky v sére leukózovým vírusom infikovaných zvierat sa zafarbí na hnedo-červeno, zatiaľ čo v sére zdravých jedincov zostáva nezmenené.

Pre prípadné kvantitatívne stanovenie titra protilátok je možné farebný komplex na tyčinke rozpustiť v etanole a farebný roztok merať spektrofotometricky pri 450 nm.

Uvedená diagnostická tyčinka sa dá využiť taktiež pri diagnostike iných onemocnení ako napr. toxoplazmóza a na stanovenie iných chorôb spôsobených baktériami a vírusmi.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Tyčinka pre diagnostiku leukémie , vyznačujúca sa tým, že je vytvorená z umelej hmoty, napríklad z polystyrénu a jej povrch je potiahnutý antigénom, napríklad dezintegrovaným materiálom vírusu bovinnej leukózy.
2. Spôsob prípravy tyčinky podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že sa na tyčinku z umelej hmoty napríklad polystyrénu alebo silikonovej gumy naadsorbuje v prvom stupni antigén pri teplote 4 až 37° C v priebehu 2 až 18 hodín a v druhom stupni sa povrch aktívnej časti tyčinky saturuje roztokom želatiny v pufovacom roztoku napríklad 0,02 M 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol-hydrochloride o pH 7,6.