



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

225868

(11) (B1)

(22) Prihlásené 08 09 81
(21) (PV 6594*-81)

(51) Int. Cl.³
A 61 K 39/255
G 01 N 33/54

(40) Zverejnené 29 07 83

(45) Vydané 15 10 85

(75)
Autor vynálezu

LEŠNÍK FRANTIŠEK doc. MVDr. CSc., DANIHEL MILAN MVDr., KOŠICE

(54) Spôsob prípravy A antigénu na imunodifúziu diagnostiku Markovej choroby

1

Vynález sa týka spôsobu prípravy A antigénu na imunodifúziu diagnostiku Markovej choroby hydiny.

V súčasnosti bolo vyvinutých iba niekoľko spoľahlivých metód používaných v praxi na diagnostiku Markovej choroby hydiny. Jedná sa predovšetkým o imunofluorescentnú metódu, ktorou sa dokazuje prítomnosť vírusu Markovej choroby v organizme vyšetrovanej hydiny. Táto metóda je časovo náročná, nakoľko vyžaduje prípravu a kultiváciu bunkových kultúr, najčastejšie kačacích fibroblastov, ktoré sa pripravujú z málo prístupných kačacích embryí alebo kuracích obličiek. Posledne menovaná bunková kultúra patrí medzi relatívne náročné bunkové kultúry, nakoľko ich kultivácia vyžaduje prítomnosť CO₂ a kurčatá, z ktorých sa pripravujú obličkové kultúry mali by byť geneticky vnímavé k vírusu Markovej choroby a prosté špecifických patogénov.

Uvedené nedostatky sú odstránené u spôsobu prípravy A antigénu na imunodifúziu charakteristiku Markovej choroby podľa vynálezu, ktorý spočíva v odobraní, prípadne príprave biologického materiálu, jeho homogenizácie, centrifugácii a čistení dialýzou, alebo precipitáciou a lyofilizácií a ktorého podstatou je, že koža odstránená a zmrazená minimálne na -20 °C z infikovaných virulentným vírusom Markovej choroby alebo koža odstránená a zmrazená na -20 °C minimálne, z čerstvých kadavérov hydiny pozitívnych na Markovu chorobu alebo kultivačné médium bunkových kultúr s pomnoženým virulentným vírusom Markovej choroby sa homogenizuje za súčasného chladenia, ďalej sa na homogenát pôsobí ultrazvukom, a to najmenej 6-krát 25 až 35 a pri 4 °C použitím 12 až 15 amplitúd; homogenát z koží sa ďalej centrifuguje pri 5 000 až 10 000 obrátkach, min⁻¹ 10 až 25 minút za získania supernatantu, ktorý sa ďalej centrifuguje pri 8 000 až 10 000 g 20 až 30 minút, prípadne ešte ďalej pri 80 000 až 100 000 g jednu hodinu.

225868

Ďalej sa takto získaný supernatant zahustí dialýzou pri 4 °C za použitia polyetylén-glykolu alebo precipitáciou roztokom síranu amonného a to minimálne na jednu desatinu pôvodného objemu a získaný dialyzát resp. koncentrát sa lyofilizuje.

Postupovať je možné aj tak, že v prípade použitia kultivačného média s A antigénom sa médium po homogenizácii a pôsobení ultrazvukom centrifuguje pri 8 000 až 10 000 obrátkach. min⁻¹ 15 až 25 minút a supernatant sa precipituje roztokom síranu amonného, ďalej sa získaný precipitát resuspenduje najmenej na jednu desatinu pôvodného objemu a dialyzuje proti destilovanej vode 40 až 50 hodín pri 4 °C. Získaný dialyzát je prípadne možné ďalej dialyzovať minimálne na desatinu pôvodného objemu za použitia polyetylén-glykolu a ďalej lyofilizovať.

A antigén, resp. kožný antigén vírusu Markovej choroby sa lokalizuje predovšetkým v epitelových bunkách perových folikulov hydiny, infikovanej virulentným vírusom Markovej choroby, pričom nositeľom, respektíve producentom tohto antigénu je iba virulentný vírus. Pripravený A antigén, je kožný antigén virulentného vírusu Markovej choroby a využíva sa na dôkaz precipitačných protilátok v sére, proti tomuto antigénu, za použitia referenčného séra obsahujúceho špecifické protilátky proti A antigénu, respektíve kožnému antigénu.

Výhodou spôsobu prípravy podľa vynálezu je to, že lyofilizované referenčné sérum je možné uskladňovať pri teplote 4 °C po dobu minimálne jedného roka.

Predmet vynálezu je opísaný na príkladoch prevedenia.

Pr í k l a d 1

Použila sa koža z 30-dňových kurčiat, ktoré boli v prvý deň života infikované virulentným vírusom Markovej choroby a to štandardným virulentným kmeňom HRPS-16. Koža odstránená z kurčiat sa až do ďalšej prípravy uchovávala pri teplote -20 °C. Ďalej sa koža homogenizuje pomocou bežného mixéru tak, aby neprišlo k jeho prehriatiu za pridávania ľadových kociek destilovanej vody. Po získaní homogénnej pasty sa homogenát vystavil pôsobeniu ultrazvuku a to šesťkrát 30 sekúnd pri 40 °C použitím 12 až 15 amplitúd. Homogenát sa ďalej centrifugoval na laboratórnej centrifúge pri 8 000 obrátkach/min⁻¹. Získaný supernatant sa ďalej centrifuguje pri 10 000 obrátkach/min⁻¹ 30 minút a pri 100 000 obrátkach/min⁻¹ jednu hodinu. Posledný supernatant sa zahustí dialýzou proti 35% polyetylén-glykolu o molekulovej hmotnosti 6 000 a získaný dialyzát sa lyofilizuje.

Pr í k l a d 2

Postupovalo sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa použila koža z čerstvých kadeverov hydiny, u ktorých v rámci patologicko-anatomického vyšetrenia bolo zistené, že sú pozitívne na akútnu - nádorovú Markovu chorobu.

Namiesto dialýzy sa posledný supernatant zahustil soľnou precipitáciou roztokom 50% síranu amonného a to na jednu desatinu pôvodného objemu. Získaný koncentrát sa lyofilizuje.

Pr í k l a d 3

Postupovalo sa ako v príklade 1, s tým rozdielom, že sa použilo kultivačné médium s A antigénom. Na rozdiel od príkladu 1 sa centrifugácia uskutočňovala pri 3 000 obrátkach/min⁻¹ 20 minút a zo supernatantu sa precipitoval A antigén s použitím 50% síranu amonného. Získaný precipitát se resuspenduje na jednu desatinu pôvodného objemu a dialyzuje proti destilovanej vode najmenej 48 hodín pri 4 °C a lyofilizuje.

P r í k l a d 4

Postupovalo sa ako v príklade 3, s tým rozdielom, že dialyzát získaný spôsobom podľa príkladu 3 sa zahustil na desatinu svojho objemu, dialýzou proti 35% polyetylén glykolu 600 a získaný koncentrát sa lyofilizoval. Molekulová hmotnosť získaného A-antigénu je okolo 70 000.

Spôsob podľa vynálezu je možné použiť na prípravu A antigénu na imunodifúziu diagnostiku Markovej choroby v agarovom géli za použitia pozitívneho referenčného séra. Prítomnosť protilátok proti tomuto antigénu poukazuje na infikovanosť, resp. vakcináciu hydiny vírusom Markovej choroby.

Spôsob prípravy A antigénu na imunodifúziu diagnostiku Markovej choroby bol overený u piatich vyšetovaných skupín kureniec z rôznych lokalít a výsledky boli porovnané s patologicko-morfologickým vyšetrením hydiny. U jednej skupiny bola potvrdená Markova choroba a to v spolupôsobení s kokcidiami a kolibacilózou.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Spôsob prípravy A antigénu na imunodifúziu diagnostiku Markovej choroby, ktorý spočíva v odobraní prípadne príprave biologického materiálu, jeho homogenizácii, centrifugácii a čistení dialýzou alebo precipitáciou a lyofilizácií, vyznačený tým, že koža odstránená a zmrazená minimálne na -20°C z kurčiat infikovaných virulentným vírusom Markovej choroby alebo koža odstránená a zmrazená minimálne na -20°C z čerstvých kadaverov hydiny pozitívnych na Markovu chorobu alebo kultivačné médium bunkových kultúr s pomnoženým virulentným vírusom Markovej choroby sa homogenizuje za chladenia, ďalej sa na homogenát pôsobí ultrazvukom a to najmenej 6-krát 25 až 35 s pri 4°C použitím 12 až 15 amplitúd, homogenát z koží sa ďalej centrifuguje pri 5 000 až 10 000 obrátkach/min⁻¹ 10 až 15 minút za získania supernatantu, ktorý sa ďalej centrifuguje pri 8 000 až 10 000 g 20 až 30 minút, prípadne ešte ďalej pri 80 000 až 100 000 g jednu hodinu a supernatant sa zahustí dialýzou pri 4°C za použitia polyetylén glykolu alebo precipitáciou roztokom síranu amonného na minimálne jednu desatinu pôvodného objemu a získaný dialyzát alebo koncentrát sa lyofilizuje.

2. Spôsob podľa bodu 1, vyznačený tým, že v prípade použitia kultivačného média s A antigénom sa médium po homogenizácii a pôsobení ultrazvuku centrifuguje pri 8 000 až 10 000 obrátkach/min⁻¹ 15 až 25 minút a supernatant sa precipituje roztokom síranu amonného, a ďalej sa získaný precipitát resuspenduje najmenej na jednu desatinu pôvodného objemu a dialyzuje proti destilovanej vode 40 až 50 hodín pri 4°C , prípadne sa ďalej dialyzuje minimálne na jednu desatinu pôvodného objemu za použitia polyetylén glykolu a koncentrát sa lyofilizuje.