



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

200 300

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 25 10 74
(21) PV 7332-74

(51) Int. Cl.³ C 12 N 7/00 ✓

(40) Zveřejněno 31 12 79
(45) Vydáno 01 12 82

(75)

Autor vynálezu IZBICKÝ ALEXEJ MUDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy suspenze viru spalniček k výrobě diagnostických preparátů

1

Vynález se týká způsobu přípravy suspenze viru spalniček k výrobě diagnostických preparátů v buněčných nebo tkáňových kulturách.

Podle dosud známých způsobů přípravy suspenze viru spalniček v buněčných kulturách se po aplikaci inokula produkčního virového kmene používá kultivačního média běžného typu, tj. bez příměsí glukózy a pyruvátu, do kterého se později vyplavuje virus, produkovaný buňkami. Nevýhodou dosavadních způsobů je, že se nedosahuje optimální produkce viru a dále, že medium je metabolizujícími buňkami poměrně rychle "vyčerpáno". Buňky degenerují, jejich funkční stav se zhoršuje. Aby se tomu zabránilo, je nutné kultivační medium včas nahradit médiem čerstvým. Tím se ovšem přeruší akumulace viru, produkovaného buňkami v médiu, takže lze dosáhnout jen relativně nízké koncentrace virové suspenze. Výměny media mimo to zvyšují pracnost postupu i eventuální riziko kontaminace kultury.

Účelem vynálezu je odstranit uvedené nedostatky.

Vynález si klade za úkol vytvořit takový způsob, u kterého by se dosáhlo zlepšených podmínek pro pomnožování viru spalniček a současně i možnosti prodloužené akumulace reprodukováného viru v médiu.

Vytčený úkol se řeší způsobem podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se pomnožování virového inokula provádí v buněčné kultuře s médiem, obsahujícím galaktózu v množství 0,5 až 1,5 g na 1 litr a pyrohroznen sodný v množství 0,25 až 0,75 g na jeden

200 300

litr média. Média tohoto typu bylo užito dosud při kultivaci různých typů buněk /Slonim D., J. Biol. Stnd., 2, 5158, 1974; Baugh C.L. et al., Life Science, 6, 371-380, 1967; Schmidt N.J. v knize Laboratorní vyšetřovací metody virových a rickettsiálních nákaz, Lenette E.H. et al. ed., Praha 1974/ nebo při přestování některých respiračních virů /Schmidt N.J. v knize Laboratorní vyšetřovací metody virových a rickettsiálních nákaz, Lenette E.H. et al. ed., Praha 1974/; aplikace při přípravě spalničkového viru dosud popsána nebyla.

Hlavní výhody způsobu podle vynálezu spočívají v tom, že lze dosáhnout intenzivnějšího pomnožování spalničkového viru a dále, že je možné podstatně prodloužit období akumulace reprodukováného viru v kultivačním médiu. Užitím způsobu podle vynálezu lze dosáhnout vyššího celkového výtěžku viru z daných buněčných kultur ve srovnání se způsobem dosud užívaným. Díky úsporám materiálu, respektive nižší pracnosti a nižšímu riziku eventuální kontaminace kultur se snižují náklady při přípravě suspenze spalničkového viru pro výrobu diagnostických produktů.

Podstatou vynálezu je tedy aplikace média s galaktózou a pyrohrozanem sodným na buněčné kultury, infikované virem spalniček s cílem přípravy virové suspenze pro výrobu diagnostických preparátů.

PŘÍKLAD

Na kultury buněk heteroploidní linie Vero /odvozena z ledvin opice Cercopithecus aethiops/, narostlé v lahvičích podle Rouxe /obsah 1200 ml, kultivační plocha stěny 220 cm²/, do souvislé vrstvy, monolayeru, se ve 100 ml média s galaktózou a pyrohrozanem sodným aplikuje infekční inokulum neoslabeného viru spalniček laboratorního kmene Edmonston v dávce 0,2 num TKID₅₀ na jednu baňku kultury.

Užité médium odpovídá složení Eagleova minimálního esenciálního média s neesenciálními aminokyselinami /Eagle H., Science, Washington, 130, 432-437, 1959/ v modifikaci, kdy je glukóza nahrazena galaktózou v množství 1 gram na litr a pyrohrozanem sodným v množství 0,5 gramu na jeden litr média /Baugh C.L. et al., Life Science, 6, 371-380, 1967/. Médium obsahuje dále příměs 60 mg NaHCO₃, tj. 0,8 ml komerčního roztoku 7,50% NaHCO₃ s 0,002% fenolové červeně na 100 ml média a obvyklou příměs antibiotik, 100 j. penicillinu a 100 mg streptomycinu na jeden ml média.

Infikované kultury se pak po zezátkování inkubují v horizontální poloze při teplotě + 37 °C. Je-li cílem příprava suspenze viru bez ohledu na infekční aktivitu, provádějí se zisky např. ve čtyřdenních intervalech, počínaje 4. dnem po infikování kultur, eventuálně se provede jednorázový zisk v době před kompletním rozrušením kultury. Je-li cílem produkce suspenze aktivního viru, provádějí se zisky virové tekutiny častěji, např. ve dvoudenních intervalech, počínaje 2. dnem po infikování. Při opakovaných ziscích se kultivační nádoba naplní novou dávkou 100 ml čerstvého média stejného složení a inkubuje se znovu do následujícího zisku atd., až do doby, kdy je většina kultury destruována cytopatickým účinkem virové infekce.

V konkrétním případě provedení bylo způsobem podle vynálezu získáno při pomnožování hemaglutinační aktivity v průběhu 16 dnů 8krát vyššího, při pomnožování infekční aktivity viru v průběhu 8 dnů 10krát vyššího celkového výtěžku ve srovnání se způsobem dosavadním.

Způsob podle vynálezu se může uplatnit také nepřímo při výrobě hyperimunních sér.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy suspenze viru spalniček k výrobě diagnostických preparátů v buněčných nebo tkáňových kulturách, vyznačený tím, že pomnožování infekčního inokula se provádí v buněčné kultuře s médiem, obsahujícím příměs galaktózy v množství 0,5 až 1,5 g na jeden litr média a pyrohroznanu sodného v množství 0,25 až 0,75 g na jeden litr média.