

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

50101

Patent dodatkowy,
do patentu _____

Zgłoszono: 23.I.1961 (P 95 602)

Pierwszeństwo: 28.I.1960 Wielka Brytania

Opublikowano: 14.IX.1965

Kl. 30h, 6

MKP C 12 **K** 1/06

UKD



Właściciel patentu: National Research Development Corporation, Londyn

(Wielka Brytania)

Sposób hodowania wirusa kataru nosa na drodze inkubacji w kulturze tkankowej

1

Wynalazek niniejszy dotyczy sposobu hodowania wirusa kataru nosa na drodze inkubacji w kulturze tkankowej.

Opanowanie dostępnej i dokładnej technologii hodowli wirusa kataru nosa in vitro umożliwi uzyskanie półproduktów i wytworzenie z nich szczepionki odpornościowej na ten wirus.

Dotychczas próbowano stosować różne metody hodowli tkankowej in vitro wirusa kataru nosa, które z powodzeniem stosowano do innych wirusów, lecz uzyskano wyniki negatywne.

W próbach hodowli tkankowej stosowano przeważnie temperaturę około 37°C, a wartość pH środowiska była bliska obojętnej. Próbowano hodować wirus w komórkach kurczęcia, lecz próby rozmnażania wirusa za pomocą tych komórek zawiodły.

Obecnie stwierdzono, że istnieją ściśle określone parametry hodowli tkankowej wirusa, przy których wirus się rozmnaża.

Parametrami tymi są ściśle określona temperatura hodowli i ściśle określona wartość pH środowiska hodowlanego, przy czym ważna jest raczej wartość pH niż rodzaj jonów zastosowanych do uzyskania odpowiedniego pH. Parametry te różnią się swoją wartością od parametrów stosowanych w dotychczasowych nieudanych próbach. W szczególności dotyczy to temperatury, przy której przeprowadza się inkubację. Jest ona niższa od stosowanej w dotychczasowych próbach.

2

Sposobem według wynalazku hodowlę wirusa kataru nosa człowieka przeprowadza się w kulturze żywej tkanki lub komórek. Jako materiał tkankowy służy żywa tkanka lub żywe komórki uzyskane z nerek małp, na przykład *Macacus rhesus*, *Macacus cynomolgus*, lub nerek zarodka ludzkiego. Stwierdzono, że w przypadku większości szczepów wirusa kataru nosa, najlepsze jednak wyniki uzyskuje się gdy stosuje się komórki pochodzące z nerek zarodków ludzkich, uzyskanych podczas hysterotomii 3—5 miesięczno ciężarnych kobiet. Kulturę tkankową prowadzi się najlepiej w postaci jednej warstwy komórek rosnących na pożywce. Jako pożywkę organiczną stosuje się odpowiednią ilość enzymatycznego hydrolizatu albuminy mleka (laktoalbuminy). Pożywkę organiczną wzbogaca się izotoniczną pożywką mineralną np. pożywką Parker'a 199 lub pożywką Hank'a. Można również stosować inne znane pożywki umożliwiające wzrost in vitro żywych komórek lub tkanek.

Wskazane jest aby środowisko hodowlane zawierało jeden lub więcej antybiotyków (np. penicylina, streptomycyna) w celu zabicia niepożądanych mikroorganizmów, oraz właściwy czynnik grzybobójczy jak na przykład mykostatynę.

Sposobem według wynalazku hodowlę wirusa prowadzi się w obecności substancji buforującej, w środowisku o wartości pH = 6,4—7,4. Korzystnie przy pH = 6,8—7,2.

W przypadku wprowadzenia jako substancji buforującej kwaśnego węglanu metalu alkalicznego, zwłaszcza NaHCO_3 , sól tę stosuje się w środowisku w stężeniu 0,001–0,01 m, najkorzystniej w stężeniu 0,002–0,005 m. Można jednakże użyć innych substancji, na przykład roztworu buforowego fosforanu sodowego, którym doprowadza się pH do wartości 7,14–7,69 przy końcowym stężeniu tej soli w środowisku równym 0,05 m.

Do rozwiniętej kultury tkankowej wprowadza się materiał zawierający przynajmniej jeden szczep wirusa kataru nosa. Zakażony wirusem materiał, pochodzący od człowieka, można łatwo uzyskać przy przepłukiwaniu nosa lub gardła.

Hodowlę wirusa przeprowadza się przy wyżej podanej wartości pH w temperaturze 30–36°C. Najbardziej odpowiednie temperatury są 31–35°C, korzystniejsze między 32–34°C. Najlepsze jednak wyniki uzyskuje się w temperaturze około 33°C do 34°C. W tych warunkach wirus kataru nosa człowieka rozmnaża się kosztem żywych komórek środowiska hodowlanego. W czasie inkubacji pożywka wraz z tkanką lub komórkami powinna pozostawać w ciągłym ruchu, najlepiej przez obracanie naczynia zawierającego pożywkę i materiał tkankowy. Stwierdzono, że przy hodowli badanych szczepów wirusa kataru nosa sposobem według wynalazku uzyskuje się wirus w fazie ciekłej środowiska hodowlanego. Po przeprowadzeniu inkubacji w czasie 2 do 14 dni, lepiej 4–12 dni, najkorzystniej w czasie 6–9 dni fazę ciekłą zawierającą wirus oddziela się od stałych składników przez odwirowanie.

Jeśli substancję wirusową otrzymaną według wynalazku stosuje się do otrzymywania szczepionek przeciw katarowi, to należy wirus zawarty w fazie ciekłej zateńczyć na przykład przez ultrawierowanie, dializę lub przez przeprowadzenie przez kolumnę jonitową.

Jest rzeczą zrozumiałą, że nie wszystkie szczepy wirusa kataru nosa będą rosły w opisanym powyżej środowisku. Z łatwością można jednak określić przydatność środowiska dla hodowli różnych szczepów wirusa kataru nosa. W tym celu badany wirus inkubuje się jak opisano powyżej, następnie materiał komórkowy pożywki bada się pod mikroskopem. Wystąpienie charakterystycznych zmian degeneracyjnych w komórkach świadczy o rozwoju badanego szczepu wirusa.

Moc otrzymanych preparatów wirusowych można określić za pomocą testu cytopatologicznego.

Stwierdzono, że cytopatologiczny efekt wywołany przez aktywne cząstki wirusa kataru nosa w kulturze żywych komórek zwierzęcych, dostarcza środków do badania mocy stosowanych preparatów. Kiedy inkubację prowadzi się zgodnie z warunkami określonymi przez niniejszy wynalazek, efekt cytopatologiczny zakaźnych cząstek wirusa objawia się w zmianach degeneracyjnych komórek, w tworzeniu się tak zwanych blaszek, które z łatwością dostrzegalne są pod mikroskopem. Po pewnym okresie trwania inkubacji zaczynają się pojawiać w warstwie komórek blaszki, jako wynik działania pojedynczych cząstek wirusa, którym uprzednio zaszczepiono hodowlę. Blaszkę te nazy-

wane są w opisie blaszkami pierwotnymi. W czasie inkubacji wirus się rozmnaża, a reprodukowany wirus rozprzestrzenia się w warstwie komórek, zapoczątkowując powstanie tak zwanych wtórnych blaszek. Należy podkreślić, że tylko ilość pierwotnych blaszek istotnie przedstawia stopień mocy początkowo użytego preparatu wirusa. Na podstawie obserwacji mikroskopowych można obliczyć ilość blaszek pierwotnych, a zatem ustalić stopień mocy preparatu.

Nie można ustalić dokładnie odpowiedniego czasu, po upływie którego trzeba przeprowadzić obserwację, aby policzyć pierwotne blaszki. W każdym podanym przypadku czas ten będzie zależał od użytego materiału komórkowego, szczepu wirusa zastosowanego do badań i jego mocy oraz od warunków hodowli. Optymalny czas, po upływie którego przeprowadza się obserwację może wynieść od dwóch do dwunastu dni (na przykład 5 lub 6 dni) po rozpoczęciu inkubacji, lecz doświadczony operator przeprowadzający badania będzie z łatwością mógł ustalić optymalny czas. W czasie powstawania pierwotnych blaszek, ilość ich w porównaniu z ilością blaszek występujących w doświadczeniu kontrolnym ze standartową ilością wirusa, będzie wskazywała na przybliżony stopień mocy badanego preparatu w stosunku do standardu. Oczywiście, oznaczenie mocy preparatu będzie wtedy najdokładniejsze, gdy badanie to przeprowadzi się w momencie kiedy pojawiła się maksymalna ilość pierwotnych blaszek, a jeszcze nie powstały blaszki wtórne.

Następujące przykłady ilustrują sposób według wynalazku.

Przykład I. Przygotowuje się zawiesinę komórek nerkowych małpy z pierwotnej hodowli tkanki nerkowej małpy. Komórki te rozcieńcza się do stężenia około 60.000 na ml w środowisku zawierającym 5% surowicy cielęcia, 0,5% hydroлізу laktoalbuminy w roztworze fizjologicznym Hank'a, zawierającym 0,035% kwaśnego węglanu sodowego, 100 jednostek na ml penicyliny i 100 µg streptomycyny. Objętości po 0,5 ml zawiesiny wprowadza się do probówek, które inkubowano bez ruchu w ciągu około 3 dni. W tym czasie środowisko usuwano i zastępowano je 1,5 ml nowej pożywki, zawierającej 2% surowicy cielęcia, 0,25% laktoalbuminy, kwaśny węglan sodowy oraz antybiotyki, jak powyżej. Do każdej hodowli dodano 0,2 ml wody z przemycia nosa, pobranej od pacjentów lub ochotników zakażonych szczepem HGP wirusa kataru nosa. Hodowlę w probówkach umieszczono w wirującym bębnie, w inkubatorze o temperaturze 33°C. Po upływie około 5 dni rozpoczęła się degeneracja w warstwie komórek, po około 10-ciu dniach degeneracja była wyraźnie widoczna, zaś zebrane środowisko zawierało duże ilości wirusa.

Przykład II. Powtórzono przykład I, lecz używając roztworu buforowego fosforanu sodowego o pH = 7,2, w takiej ilości ażeby końcowe stężenie tej soli w środowisku wynosiło 0,05 m.

Poniżej opisano, jak można przeprowadzać badanie mocy preparatów za pomocą testu biologicznego.

Moc preparatów, zawierających wirus HGP bada się w hodowli tkanek używając drugorzędowej hodowli komórek nerkowych rezusa. Komórki te w ilościach 30.000—40.000 wprowadza się do probówek stacjonarnych do 0,5 ml pożywki, zawierającej 0,5% surowicy cielęcia, 0,5% hydrolizatu laktalbuminy (LAH) w roztworze fizjologicznym Hank'a, zawierającym 0,03% kwaśnego węgla sodowego oraz 100 jednostek penicyliny, 100 µg streptomycyny i 20 jednostek mykostatyny na ml. Najlepsze wyniki uzyskuje się przy użyciu środowiska wykazującego średnie pH = 7,0—7,4, przy czym ważna jest raczej wartość pH niż rodzaj zastosowanych jonów, tak że zamiast kwaśnego węgla sodowego można zastosować roztwór buforowy fosforanu sodowego o pH = 7,14—7,69, przy końcowym jego stężeniu w pożywce wynoszącym 0,05 m. Po upływie okresu hodowli stacjonarnej, trwającym od 24 do 48 godzin w temperaturze 36°C, usuwa się środowisko hodowli i zastępuje się je 1,5 ml pożywki, zawierającej 2% surowicy cielęcia, 0,25% hydrolizatu laktalbuminy oraz posiadającej inne składniki pierwotnej pożywki w stosunkach określonych powyżej.

Następnie hodowle zaszczepia się albo bezpośrednio po, albo w ciągu dnia po zmianie pożywki, ściśle określoną próbką pobraną z preparatu wirusa badanego na stężenie. Zaszczepione hodowle inkubuje się w temperaturze 33°C w bębnie obrotowym, w warunkach opisanych w przykładzie I. Próby w probówkach badano pod mikroskopem na drugi lub trzeci dzień po inkubacji, przy czym ilość blaszek pojawiających się w warstwie komórek była wprost proporcjonalna do stężenia wirusa w badanym preparacie. Oczywiście, przy obliczaniu blaszek konieczne było oznaczenie minimalnej ilości ognisk z komórkami uszkodzonymi, które były liczone jako blaszka. I tak na przykład przyjęto, że uszkodzenie ogniskowe musi zawierać przynajmniej 10 komórek, aby zostało zanotowane jako blaszka. Konieczne było dla celów porównawczych zastosowanie tego samego systemu liczenia zarówno do badanych preparatów, jak i do standardowej ilości badanego w ten sam sposób wirusa. Przy ocenianiu zaobserwowanych wyników można umownie pominąć próbki, wykazujące niezwykle wysoką liczbę blaszek, na przykład 15 lub 18. Stwierdzono, że po około trzech dniach ilość blaszek zwiększyła się. Można więc przyjąć, że te późniejsze blaszki były blaszkami wtórnymi.

Wykazano także, że ilość blaszek zmniejsza się, jeżeli przed zaszczepieniem środowiska hodowli wirus HGP zostanie zmieszany ze specyficzną, otrzymaną z królika surowicą odpornościową. Dlatego też można stosować powyżej opisaną metodę badań nie tylko jako metodę kontrolną przy wytwarzaniu szczepionek, lecz także w połączeniu ze specyficzną surowicą odpornościową do identyfikowania i kontrolowania szczepów wirusa włączanych do szczepionki. Ponadto można używać tej metody do oceny reakcji antyciał na kontrolne szczepionki doświadczalne, podawane zwierzętom lub ludziom.

Zaznacza się, że zamiast małych komórek nerkowych przy oznaczaniu mocy preparatu, można zastosować komórki owodni i ludzkie komórki nerkowe, chociaż w tych przypadkach, blaszki trudno policzyć. Metoda badawcza i sposób według wynalazku można stosować do szczepu PK, HGP i do innych szczepów wirusa kataru nosa człowieka.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób hodowania wirusa kataru nosa na drodze inkubacji w środowisku hodowlanym zawierającym komórki lub tkankę pochodzenia ludzkiego lub małpiego, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się w środowisku zawierającym żywe komórki lub tkankę nerkową zarodka ludzkiego lub małpią w temperaturze 31—35°C, korzystnie 32,5—33,5°C oraz przy pH = 6,4—7,2, korzystnie przy pH = 6,8—7,2.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w czasie inkubacji pożywkę i tkankę lub komórki wprowadza się w ruch obrotowy.
3. Sposób według zastrz. 1 i 2, **znamienny tym**, że do środowiska hodowlanego wprowadza się kwaśny węglan alkalicznego metalu, zwłaszcza kwaśny węglan sodowy, do osiągnięcia jego stężenia w środowisku wynoszącego 0,001 m — 0,01 m, korzystnie 0,002—0,005 m.
4. Sposób według zastrz. 1—3, **znamienny tym**, że do środowiska hodowlanego wprowadza się jeden lub więcej antybiotyków.
5. Sposób według zastrz. 1—4, **znamienny tym**, że do środowiska hodowlanego wprowadza się czynnik grzybobójczy.
6. Sposób według zastrz. 1—5, **znamienny tym**, że stosuje się tkankę lub materiał komórkowy występujący w postaci jednej warstwy komórek rosnącej na pożywce.