



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

202885

(11)

(81)

/22/ Přihlášeno 29 12 78  
/21/ /PV 9137-78/

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 M 1/22

(40) Zveřejněno 30 05 80

(45) Vydáno 15 09 82

(75)

Autor vynálezu

KOUKAL MIROSLAV prom. biol., NOVÝ HRÁDEK a SMOLOVÁ MARTA, BOHDAŠÍN

## (54) Zařízení pro kultivaci a uchovávání buněčných kultur pro virologické a cytologické testy

1

Vynález se týká zařízení pro kultivaci, zmrazování, skladování a rekultivaci buněčných kultur. Postup a zařízení umožňují rychlejší a standardnější detekci a izolaci zejména virových agens, organicky slučují dosud obvykle jednotlivě prováděné metodické úkony pro přípravu buněčných kultur jako vnímavého materiálu pro záchyt virů a umožňují současně použít širší metodické spektrum vizualizace virových antigenů.

Obtížnost detekce virových činitelů vyplývá z jejich vlastností pomnožovat se výhradně v živých vnímavých buňkách, na rozdíl od většiny jiných infekčních agens /baktérie, mykoplasmata, plísňe atd./, která můžeme kultivovat na předem připravených snadněji dostupných umělých živných půdách.

V současné době existují ve virologii různé metodické přístupy pro detekci a průkaz virových antigenů, z nichž velká většina využívá metod buněčných kultur in vitro. Kromě virologie se buněčných kultur in vitro používá v nejrůznějších výzkumných odvětvích cytologie, imunologie a dalších.

Pro příslušnou virologickou techniku nebo sérii diagnostických a izolačních metod se v konkrétní praxi využívá vnímavých buněčných kultur odvozených z příslušných orgánů /tripsinizačně, fragmentárně/ nebo se tyto buněčné kultury rekultivují ze zmrazené suspenze nebo, pokud jsou k dispozici, se pasážují za účelem pomnožení a teprve následně distribuují do příslušných kultivačních zařízení.

Pro účely vizualizace virových antigenů cytopatickým efektem nebo fluorescenční metodou je používáno obvykle vložených krycích sklíček s nárůstem buněk do Leightonových nebo normálních zkumavek. Hemadsorpční, hemaglutinačněinhibiční a plakové testy se provádějí převážně ve zkumavkách nebo lahvích /Roux-, Black-, Carrel-, Müller- typu/, seroneutralizační testy a titrační metody se většinou provádějí ve zkumavkách nebo zařízení typu mikrotitračních destiček.

Jednotlivě volená kultivační zařízení limitují spektrum použitelných virologických

metodik. Např. z USA patentu č. 3 597 326 je známo zařízení, které obsahuje na podložce z průhledné umělé hmoty, například ze styrenu, několik řad misek pro pěstování buněčných kultur, které jsou přikryty těsnícím víčkem. Jednotlivé sady těchto misek lze vrstvit na sebe. Toto zařízení nelze hermeticky uzavřít tak, aby sneslo zmrazovací podtlak v tekutém dusíku a není umožněn centrální přístup k jednotlivým kultivačním oddílům. Mimoto nelze kultivovat v normální atmosféře.

Inokulace nelze provést jinak než ve sterilním prostředí /odklopením víčka/ a mikroskopicky lze prohlížet vzorek jen zvětšením cca 100- až 200krát. Rovněž vzorky monolayeru nelze z poměrně silného dna vykrojit bez porušení vlastního vzorku. Podobné řešení má US patent č. 3912596.

Nevýhodou dosavadních postupů při využívání buněčných kultur k diagnostickým účelům je skutečnost, že vhodná buněčná kultura není okamžitě k dispozici k příslušnému úkonu, a že zmiňovaná kultivační zařízení nemohou být současně využita jako skladovací, transportní a rekultivační.

Uvedené nedostatky stávajících metodik z velké části odstraňuje zařízení podle vynálezu, jehož podstatou je, že sestává z umělohmotného výlisku nebo výlitku, s výhodou ve tvaru Petriho misky, jejíž spodní část má symetricky uspořádané komůrky se spodními dny sloužícími jako podloží pro nárůst buněčných kultur a horní část je ve tvaru víčka s centrálním výstupkem, přičemž obě tyto části mají na obvodu plochý okraj pro hermetické uzavření celého zařízení.

Zařízení podle vynálezu umožňuje, aby se monolayerový nárůst kultur zmrazil podle předem stanovené závislosti poklesu teploty na čase, skladoval a transportoval přímo na kultivačním podloží v hermeticky uzavřeném sterilním a průhledném zařízení, kde bezprostředně před virologickým nebo cytologickým testováním se buněčné kultury rozmrazí za sterilních podmínek.

Výhody zařízení podle vynálezu jsou zejména:

1. Zařízení je vyrobeno z umělé hmoty, netoxické pro kultivované buňky, která je průhledná pro sledování buněčných kultur makroskopicky i mikroskopicky.
2. Vnitřní plochy zařízení umožňují adhezi a proliferaci buněk a jsou do té míry tenké, že dovolují mikroskopování kultur i výkonnými objektivy s krátkou ohniskovou vzdáleností ve fázovém kontrastu fluorescenčním mikroskopem.
3. Zařízení umožňuje vyřiznutím vnitřní plochy zpracování pro různá elektromikroskopická vyšetření.
4. Zařízení umožňuje aplikaci radioisotopických metod.
5. Zařízení je hermeticky uzavřené, což je nutným předpokladem kultivace buněk v médiích s běžně užívaným bikarbonátovým ústrojím.
6. Zařízení je sterilní. Pokud je třeba nutná manipulace za sterilních podmínek, je toto umožněno středovým vpichem do všech sekcí a pokud zpracováváme kultury například pro visualisaci antigenů, je možné víčko jednoduše odstříhnout nůžkami.
7. V zařízení je možná i kultivace orgánových kultur i buněčných kultur nádorového původu.
8. Zařízení je skladovatelné v běžně vyráběných kontejnerech na tekutý dusík nebo v suchém ledu.
9. Zařízení je výhodné i z bezpečnostních důvodů pro jednoduchou dekontaminaci /spálením/.
10. Pro trvalé preparáty lze vložit na dno zařízení sklička ve tvaru daného sektoru /jako Leightonovy zkumavky/.
11. Použití způsobu a zařízení podle vynálezu umožňuje centrální přípravu různých buněčných kultur pro velký počet zdravotnických pracovišť humánních a veterinárních.
12. Zařízení je jednoduché, modifikovatelné, lehce vyrobitelné ve velkých sériích a levné.

Při eventuální obtížnosti zmrazení a rekultivace určitého typu buněk přímo na podloží lze toto zařízení využít pro dodatečnou rekultivaci buněk zmrazených v suspenzi v prostoru zařízení. Při tomto alternativním způsobu je určité časové zpoždění, dané dobou, během které buněčná suspenze po rozmrazení a aplikaci na kultivační podloží doroste do monolayeru. Zůstávají zachovány výhody jednoduché manipulace pro rutinní diagnostické účely i možnost

skladování, transportu a kultivace. Pro cytologické účely je tento alternativní způsob, tj. zmrazování buněk v suspenzi, v mnoha případech výhodnější.

Zmrazování buněk se provádí podle předem stanovené závislosti poklesu teploty na čas. Rychlost zmrazování, kryoprotektivní látky /dimethylsulfoxid, glycerin/ a jejich koncentrace v zmrazovacích médiích je nutno volit pro příslušné typy buněčných kultur individuálně. Pokles teploty se obvykle pohybuje v rozmezích 0,5 až 2 °C za minutu, s výjimkou oblasti eutektického bodu.

V této oblasti, kde dochází k uvolňování skupenského tepla, se osvědčilo rychle snížit teplotu okolního prostředí. Koncentrace dimethylsulfoxidu je optimální v rozmezí 7,5 až 12,5 procent. Pro některé buněčné kultury je výhodnější použít glycerinu. Zmrazovací médium nesmí obsahovat antibiotika. Rovněž opracování buněčných kultur před zmrazením, např. versenem nebo trypsinem a synchronizace buněčných kultur před zmrazováním vyžaduje individuální přístup k jednotlivým buněčným typům. Tento postup je nutno předem odzkoušet a pro daný typ buněk charakterizovat.

Po rozmrazení, které je nutno provádět rychlou metodou, nejlépe ponořením zařízení do cirkulující vody 37 °C teplé, např. v Heplerově přístroji nebo Cyklotermu a odsátí zmrazovacího média, přičemž by úkon neměl převýšit doby 3 minut, lze buněčných kultur s nízkou mortalitou buněk použít okamžitě k testování virologických vzorků. V případě vyšší úmrtnosti buněk /cca 30 %/ je výhodné nechat buněčné kultury dorůst opět do monolayerů, čehož je možno dosáhnout obvykle do 24 hodin po rozmrazení a výměně zmrazovacího média za kultivační. V případě, že mortalita buněčných kultur po rozmrazení je vyšší než 50 %, je lépe využít alternativní metody paralelního zmrazení buněčné suspenze. Typ buněčné kultury, jakož i tvar kultivačního podloží se zvolí podle předpokládané metodiky nejefektivnější pro danou cytologickou a virologickou práci.

Další výhody nové metody spočívají v možnosti rychlého použití, větší standardnosti jednotlivých metodik, umožňují srovnání a opakovatelnost na tomtéž homogenním materiálu, pouze později rozmrazeném, umožňuje centralizaci přípravy většího množství těchto zařízení, z jediného a jednorázově kontrolovaného zdroje citlivé buněčné kultury. Při přípravě těchto nakultivovaných a zmrazených tkáňových systémů in vitro, která bude centralizována, lze tyto materiály pro jednotlivé laboratoře ekonomičtěji zajistit. Skladovat lze větší množství namnoženého materiálu v běžných nádobách pro skladování vzorků v tekutém N<sub>2</sub> nebo pevném CO<sub>2</sub>, event. v hlubokomrazicích pultech a poměrně snadno transportovat v přítomnosti pevného CO<sub>2</sub>.

V případě kultivací na agarosové vrstvičce na podloží nebo přímo na umělohmotném podloží je umožněno vyříznutí i jednotlivých, virem efektovaných nebo suspektních buněk z daného systému, např. mikromanipulátorem. Tento odebraný vzorek je potom možno zmrazit a nakrájet běžnými technikami pro elektronmikroskopické vyšetření. Při potřebě zhotovit trvalé preparáty je možno podloží s nárůstem buněk přímo vystříhnout a zamontovat běžnými technikami na podložní sklička. V některých testech, např. určitých typů fixací, lze pomnožit buněčné kultury na vložených krycích sklíčkách na dno kultivačního zařízení.

Navrhovaným způsobem lze zajistit orientační virovou diagnostiku běžně i v menších nemocnicích a transfúzních stanicích. Nutné vybavení by sestávalo pouze ze skladovacího prostoru vybaveného pevným CO<sub>2</sub> nebo z kontejnerů tekutého N<sub>2</sub>, sterilního boxu /dostačuje Hansenova skříň nebo "Laminflow"/, termostatu s nastavitelnou regulací tepla pro kultivaci, obvykle 37 °C.

Při menší úpravě by se mohly některé získané virologické vzorky inokulovat na buněčnou kulturu přímo v terénu, takže by se zamezilo případným inaktivacím virových činitelů dlouhým skladováním a transportem do míst, která jsou pro virologickou diagnostiku vybavena. Jednotlivé laboratoře by mohly poté provádět orientační diagnostiku bez zvláštního technického vybavení a bez personálu erudovaného v oblasti tkáňových kultur.

Zařízení k provedení navrhovaného postupu s výhodou sestává ze sady umělohmotných průsvitných a sterilizovatelných výlisků /výliteků/, skládajících se ze dvou lisovatelných částí. Dolní část je rozčleněna na 6 až 9 polí, které mají plochu větší než 1 cm<sup>2</sup> a jsou odděleny přepážkami z téhož materiálu. Ve středu dolní části může být vylisována jamka ve tvaru spodní části zkumavky, sloužící ke zmrazení buněčné suspenze ve zmrazovacím médiu.

Obsah zmrazených buněk dostačuje k následné rekultivaci nebo sériovému zpracování na ploškových polí /komůrek/ tohoto výlisku nebo výlitku. Horní část /víčko/ zařízení může

být s výhodou ve tvaru víčka Petriho misky se středovou vyvýšeninou umožňující centrální přístup ke všem ploškám /u alternativního zařízení i k spodní centrální jamce/ při aplikaci, odsávání a inokulaci buněčné suspenze, nejlépe injekční jehlou. Obě části jsou ze stejného materiálu a spojitelné na okraji.

Velikost a tvar zařízení je koncipován tak, aby umožnil zmrazování a skladování v běžně dostupných skladovacích Dewerových nádobách pro tekutý dusík s vložitelnými skladovacími pouzdry ve tvaru válce o průměru cca 6,5 x 30 cm, přičemž jednotlivá zařízení zapadají horní částí jednoho výlisku /výlitku/ do dolní části dalšího.

Naskládání jednotlivých výlisků /výlitéků/ umožňuje vyvýšenina ve tvaru trnu na víčku zařízení. Horní část trnu může být ve tvaru malé jamky, která zapadá do spodní části výlisku /výlitéku/ dalších zařízení a lépe umožní hermetické uzavření otvoru po vpichu při zmrazování, kultivaci a transportu.

Velikost zařízení je volena tak, že umožňuje centrifugaci jednotlivých výlisků /výlitéků/ i jejich sady ve větších centrifugách, např. Janetzki K 70, což je nezbytné pro sedimentaci suspenze buněk v centrální jamce při alternativním řešení.

Popsané zařízení, obsahující řadu komůrek, je možno použít též k rekultivaci a sériovým testům s virologickým a cytologickým materiálem v případě, že buněčné suspenze cíleně vybrané k daným testům budou zmrazeny samostatně v nádobkách ověřených pro zmrazování, např. polyethylenové trubičky, nádobky a ampule z PVC. Plošky komůrek umožňují screeningové odečítání běžných virologických a cytologických metodik /seroneutralizační testy, imunofluorescenční metody, různé druhy titrací, některé radioizotopové metody a další/.

Dále jsou uvedeny příklady zařízení podle vynálezu. Na přiložených výkresech 1 až 6 jsou schematicky znázorněny příklady zařízení dle vynálezu. Na obr. 1 v půdorysném pohledu je znázorněno uvedené zařízení sestávající z umělohmotného výlisku ve tvaru Petriho misky, jejíž spodní část 4 sestává ze symetricky uspořádaných komůrek 1 se spodními dny 2, které slouží jako podloží pro kultivaci buněk. Na obr. 2 je znázorněna v půdorysu horní část 3 zařízení. Horní část 3 tvoří víčko s centrálním výstupkem 8, který slouží jako vstup, případně výstup do komůrek 1 /injekční jehlou/.

Na obr. 3 je celé zařízení znázorněno v nárysu. Obě části, tj. spodní část 4 a horní část 3, mají po obvodu plochý okraj 7 pro hermetické uzavření celého zařízení. Na obr. 4 až 6 je znázorněn příklad dalšího typu zařízení podle vynálezu pro buňky v suspenzi.

Na obr. 4 v půdorysu je znázorněna spodní část 4 s komůrkami 1 ve tvaru dutých válečků s rovným dnem v počtu šest s jednou centrální jamkou 5 pro zmrazení buněk v suspenzi. Po obvodu části 4 je plochý okraj 7 pro hermetické uzavření obou částí 3 a 4 slisován nebo svařen.

Na obr. 5 v půdorysu je znázorněna horní část 4, která má tvar víčka s centrálním výstupkem 8 tvaru jamky.

Na obr. 6 je v nárysném pohledu znázorněno celé zařízení podle vynálezu. Centrální jamka 5 s konvexně vypuklým dnem 6 slouží ke zmrazování buněk v suspenzi, kde se tyto skladují pro případ, že je nelze udržet při zmrazování přímo na podloží. Význam kónického dna 6 je důležitý zejména pro odsávání kryoprotektivního média injekční stříkačkou /supernatan-tu/, tj. kdy buňky jsou v sedimentu.

Aby nedošlo ke zborcení zařízení, je nutno při jakémkoliv odsávání média udělat v oblasti centrálního výstupku 8 vedle otvoru vpichu ještě druhý otvor pro vyrovnání tlaku.

Způsob kultivace buněčných kultur podle vynálezu je předveden na následujícím příkladě. Úkolem je nakultivovat buněčný substrát pro záchyt a následnou diagnostiku neznámého virového agens, který je předpokládán ve vzorku nosního výtěru, který byl virologicky připraven. Před odběrem vzorku prasečích ledvin bylo na dno všech komůrek zařízení podle vynálezu pomocí Cornwallovy pipety roz distribuováno 1 ml suspenze prasečích liniových ledvinových buněk jedním vpichem ze střední horní části centrálního výstupku, a to do každé komůrky zvlášť. Poté necháme inokulovanou kulturu dorůst do monolayeru /asi 3 dny/. Po každé inokulaci případně odsátí nebo výměně média se vpich uzavře, například zakápnutím roztaveným voskem nebo PVC.

Poté podle záměru můžeme narostlé buňky využít ihned k naočkování testovacího výtěru, anebo tuto předem zkontrolovanou šarži buněk zmrazíme, skladujeme /neomezeně/, případně transportujeme do míst použití. Před zmrazením vyměníme kultivační médium za kryoprotektivní a zmrazíme podle předem stanovené závislosti poklesu teploty na čase.

V prvním případě inokulujeme do každé komůrky opět středovým vpichem 0,2 ml připraveného vzorku. Po vazbě a doplnění média se opět uzavře vpichový otvor a kultivuje se 1 týden a odečítá se cytopatický efekt /CPE/. V průběhu kultivace inokula sledujeme buněčnou kulturu optickým inverzním mikroskopem.

Poté se příslušné změny na tkáňové kultuře testovaly běžnými virologickými technikami, například fluorescencí, barvením, hemadsorpcí apod. Příslušné alterované buňky z monolayeru byly pak vykrojeny ze dna komůrky /včetně části dna/ a zpracovány pro elektron-optické vyšetření.

Podobně zařízení podle vynálezu lze využít pro serodiagnostiku, ale s tím rozdílem, že známé virové antigeny jsou obsaženy již přímo v buňkách a testují se příslušná rekonvalescentní séra, například nepřímou imunofluorescencí.

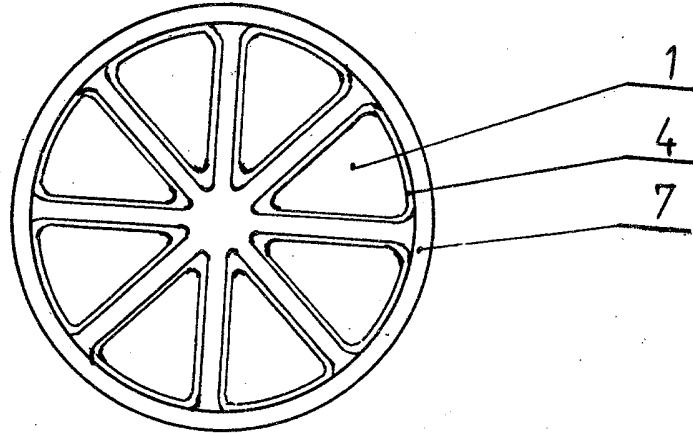
#### P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Zařízení pro kultivaci a uchovávání buněčných kultur pro virologické a cytologické testy, vyznačující se tím, že sestává z umělohmotného výlisku nebo výlitzku, s výhodou ve tvaru Petriho misky, jejíž spodní část /4/ má symetricky uspořádané komůrky /1/ se spodními dny /2/ sloužícími jako podloží pro nárůst buněčných kultur a horní část /3/ je ve tvaru víčka s centrálním výstupkem /8/, přičemž obě tyto části mají na obvodu plochý okraj /7/ pro hermetické uzavření celého zařízení.

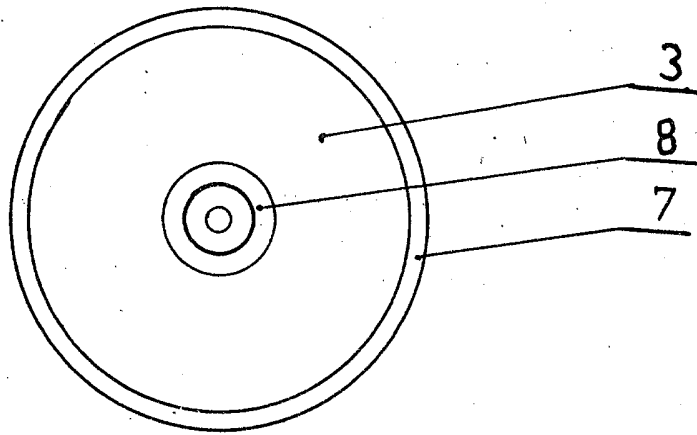
2. Zařízení podle bodu 2, vyznačené tím, že vedle komůrek /1/, které jsou rozloženy symetricky po obvodu spodní části /4/, je v jejím středu centrální jamka /5/ s konvexně vypuklým dnem /6/ pro zmrazení buněk v suspenzi.

2 listy výkresů

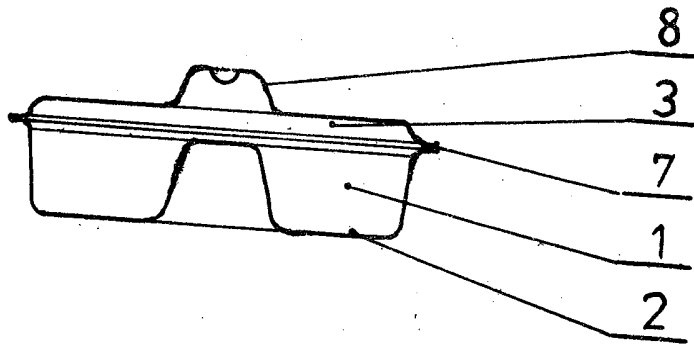
OBR. 1



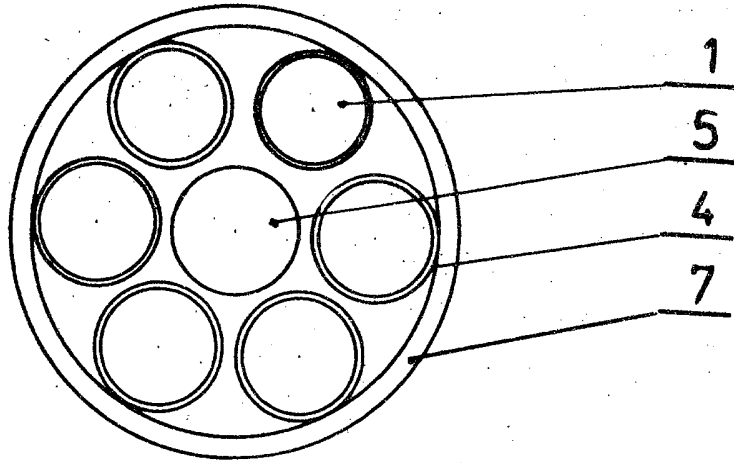
OBR. 2



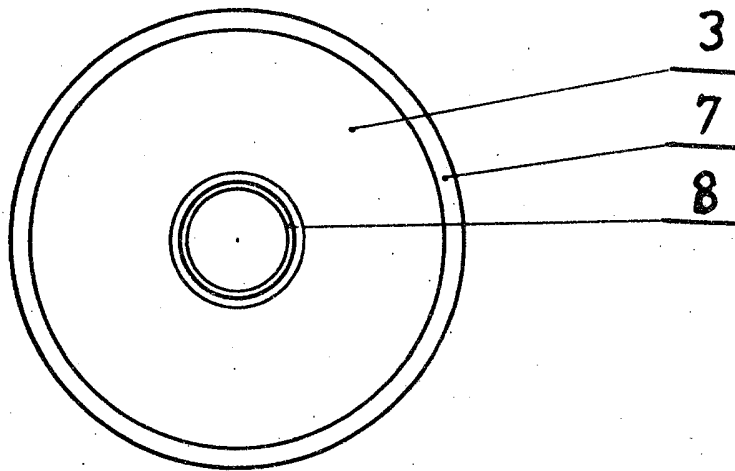
OBR. 3



OBR. 4



OBR. 5



OBR. 6

