



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

198 055

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 29 07 77
(21) PV 5026-77

(51) Int. Cl.³ C 12 N 5/00 //
C 12 Q 1/70

(40) Zveřejněno 31 07 79
(45) Vydáno 01 6 82

(75)

Autor vynálezu IZBICKÝ ALEXEJ MUDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy testovacího systému buněčných nebo tkáňových kultur pro stanovení virů nebo viry inhibujících látek

1

Vynález se týká způsobu přípravy testovacího systému buněčných nebo tkáňových kultur pro stanovení virů nebo viry inhibujících látek. Řeší zjednodušení metodiky v případech, kdy je zapotřebí prodloužené inkubace pokusných kultur.

Pomnožení /nebo inhibice pomnožení / virového inokula v buněčné kultuře je základem diagnostických postupů pro izolaci infekčního agens, pro kvantitaci infekční aktivity ve vzorcích virové tekutiny /TKID₅₀ / i inhibiční aktivity např. virusneutralizačních protilátek.

Při obecně známém postupu se k testu užívá narostlých buněčných kultur. Po výměně více méně vyčerpaného kultivačního media se aplikuje vyšetřované inokulum a v průběhu další inkubace se sledují změny v kultuře, které jsou indikátorem pomnožení viru. Při malém počtu inokulovaných infekčních částic nebo u virů s pomalejší reprodukcí je zapotřebí protrahované inkubační doby, během níž je nutno vyměňovat medium v kulturách 1 až 2krát týdně - viz na př. Mayr A. et al., Virologische Arbeitsmethoden, sv. I, VEB G. Fischer, Jena 1974 /.

Jsou známa také některá zjednodušení diagnostického postupu, která se s výhodou uplatní zvláště při seriových vyšetřováních. Při inokulaci vzorků na narostlé kultury bylo např. popsáno užití media s galaktosou a pyruvátem, umožňující nejméně 10 až 12 denní inkubaci kultur bez výměny media /Izbický A., Zprávy SEVAC 3, 81-89, 1974 /. Jinou modifikací

198 055

je inokulace testovaného materiálu přímo do suspence buněk, určených ke kultivaci v běžném růstovém mediu. Odpadá tak samostatná pracovní fáze nasazování kultury, nehledě k tomu, že tento způsob aplikace je pro pomnožování řady virů zvláště vhodný/Mayr A. et al., Virologische Arbeitsmethoden, sv. I, VEB G. Fischer Jena 1974/. Ve srovnání se známými modifikacemi přináší nové řešení další snížení pracnosti a nákladů.

Podstatou vynálezu je spojení inokulace buněk pro nárůst kultury a inokulace testovaného materiálu do jedné operace a to v mediu, v němž je glukosa nahrazena příměsí galaktózy a pyruvátu. Postup slučuje výhody menší pracnosti postupu a prodlouženého udržování kultur bez výměny média.

V novém řešení se využívá poznatku, že médium s galaktózou a pyruvátem/bez glukózy/ je vhodné jak krůstu, tak i prodlouženému udržování buněčných kultur. Dobré růstové vlastnosti galaktózy byly zjištěny při pomnožování řady druhů buněk/Willmer E. N. edit., Cells and tissues in culture, vol. I, Academic Press, London-N-York, 1965/, včetně lidských diploidních buněk WI-38 /Slonim D., J. Biol. Stand., 2, 51-58, 1974; Baugh C. L., Life Science, 6, 371-380, 1967/. Také pyruvát stimuloval růst některých buněčných linií/Willmer E. N. edit. Cells and tissues, vol. I, Academic Press, London-N-York, 1965/ i lidských diploidních buněk /Slonim D., J. Biol. Stand., 2, 51-58, 1974/. Při studiu kultivace lidských diploidních buněk/Slonim D., J. Biol. Stand., 2, 51-58, 1974/ a buněk linie VERO /Izbický A., Čs. Epidem. 26, 1, 9-14, 1977/ byl v modifikovaném Eaglově minimálním esenciálním mediu s galaktózou / 1 g/litr/ a pyruvátem /0,5 g/litr/ zjištěn vyšší pomnožovací efekt, než v mediu s glukózou. Současně v mediu s galaktózou nebo pyruvátem i v mediu s příměsí obou látek docházelo v průběhu kultivace lidských diploidních buněk/Slonim D., J. Biol. Stand., 2, 51-58, 1974/ a buněk linie Vero /Izbický A., Čs. Epidem. 26, 1, 9-14, 1977/ jen k pomalému poklesu pH a bylo v něm možné kultury protražovaně inkubovat bez výměny média /Izbický A., Zprávy SEVAC, č. 3, 81-89, 1974/. Podle výsledků naší laboratoře má modifikované Eaglovo minimální esenciální médium s galaktózou a pyruvátem vhodné vlastnosti i např. pro prodloužené/sledováno po dobu 3 týdnů/ udržování narostlých primárních kultur buněk psůh /beagle/ ledvin i pro jejich růst.

Je zřejmé, že se médium s galaktózou a pyruvátem může uplatnit při kultivaci mnoha typů buněk primárních, diploidních i heteroploidních buněčných linií a při jejich širokém diagnostickém využití. Jen lidské diploidní buňky samy o sobě mohou sloužit k diagnostice např. viru zarděnek, varicella-zoster, RSV, herpesviru, cytomegaloviru a enterovirů/Lenette E. H., Schmidt N. J. et al., Laboratorní vyšetřovací metody virových a rickettsiálních nákaz, Avicenum 1974/-buňky Vero potom viru SV 40, herpesvirů, reovirů, poxvirů, viru parotitidy, spalniček, psinky, NDV, SV5, rubely, lymfocytární choriomeningitidy, adenovirů, arbovirů ap. /Whitaker A., Tissue and cell, Bailliere Tindall, 1972/.

Novým řešením se dosahuje především ekonomického efektu, který je dán zjednodušením pracovního postupu, snížením spotřeby materiálu a u zkumavkových kultur využitím stacionární inkubace. Snížení počtu laboratorních operací kromě toho zkracuje expozici pracovníků profesionálním rizikům a zmenšuje možnost eventuální kontaminace a znehodnocení kultur.

PŘÍKLAD

Stanovení TKID₅₀ parotitického viru a virus parotitidy neutralizujících protilátek ve zkušebních kulturách buněk Vero

Buňky

Jako biologického substrátu se v testu užívá kultur buněk heteroploidní linie Vero /odvozených z ledvinné tkáně opice *Cercopithecus aethiops*/ s negativním nálezem mykoplasmatické kontaminace. Buňky se pomnožují v lahvích podle Rouxe /1200 ml/ v Eaglově minimálním esenciálním médiu /Eagle H., Science, Washington, 130, 432-437, 1959/, /Izbický A., Zprávy SEVAC č. 2, 54-60, 1974; Izbický A., Čs. Epidem., 26, 1, 9-14, 1977/.

Médium

Ve vlastním testu se užívá Eaglovo modifikované minimální esenciální médium, v němž je glukóza nahrazena galaktózou /1 g/litr/ a natrium pyruvát /0,5 g/litr/ /Baugh C.L. et al., Life Science, 6, 371-380, 1967; Slonim D., J. Biol. Stand. 2, 51-58, 1974; Izbický A., Zprávy SEVAC č. 3, 81-89, 1974/ se 7,5% inaktivovaného telecího séra a 1,2 ml roztoku 7,5 % NaHCO₃ na 100 ml média a s příměsí penicillinu a streptomycinu /100 j., respektive 100 mg na 1 ml média/- dále jen MEM-GaPy.

Příprava inokula pro virusneutralizační test

Dvojnásobná řada ředění /2⁻ⁿ/ vyšetřovaného séra /inaktivovaného/ se smísí se stejným objemem virové tekutiny /např. Endersův laboratorní kmen viru parotitidy/ o obsahu 100 TKID₅₀ v 1 ml a inkubuje se při 37 °C po dobu 60 minut nebo při +4 °C 18 hodin.

Vlastní test

Bezprostředně před zahájením vlastního testu se připraví suspenze buněk Vero /z Roux lahví uvolněny pomocí roztoku 0,01 % trypsinu s 0,02 % versenu-dvojsodná sůl EDTA v densitě 300 000 buněk na 1.3 ml média MEM-GaPy /cca 231 000 buněk/ml/ a až do inokulace se udržuje v chladu /+4 °C/.

Ředění vzorku pro stanovení TKID₅₀ /geometrická řada 10⁻ⁿ v médiu MEM-GaPy/ se provádí průběžně během pokusu, séra pro stanovení obsahu virusneutralizačních protilátek je nutno zpracovat předem /viz příprava inokula pro virusneutralizační test/.

Do zvoleného počtu /např. deset u testu TKID₅₀ a čtyři u virusneutralizačního testu/ zkumavek průměru 16 mm a délky 100 mm se inokuluje po 1.3 ml buněčné suspenze a po 0,2 ml příslušného ředění testovaného materiálu. Zkumavky se potom zazátkují gumovými zátkami, důkladně protřepou a uloží ke stacionární inkubaci v šikmé poloze při teplotě +37 °C na dobu deseti dnů.

Odečítání

Přestože se pomnožení parotitického viru v kultuře buněk Vero zpravidla projeví zřetelným cytopatickým efektem /tvorba syncyí až destrukce monolayeru/, je vhodné sledovat také hemaglutinaci kuřecích erytrocytů v médiu jednotlivých zkumavek a výskyt hemadsorpce.

Po skončené inkubaci se zkumavky odzátkují a do média /1.5 ml/ se přidá po 0.2 ml suspenze třikrát promytých 3 % kuřecích erytrocytů v roztoku PBS /Dulbecco, Vogt, J. Exper. Med. 99, 167-182, 1954/ bez Ca⁺⁺ a Mg⁺⁺, důkladně protřepou a ponechají v klidu ve vertikální

198 055

poloze v inkubátoru + 37 °C po dobu 30 minut, a potom při laboratorní teplotě do vytvoření sedimentu kontrolních zkumavek/kontrola erytrocytální suspenze/.

Potom se prostým okem odečte hemaglutinace, u kultur s negativní nebo nejasnou hemaglutinací se konečný výsledek ověří mikroskopicky /zvětšení 6 x 10/ podle výskytu hemadsorpce nebo cytopatického efektu.

Při testování infekční aktivity se hodnoty $TKID_{50}$ stanoví výpočtem podle Reeda a Muenchea /Amer.J.Hyg.,27,493,1938/ a vyjádří v negativních log 10 .

Při stanovení virusneutralizačních protilátek se titr určí jako ředění séra, které sníží počet destruovaných buněk v kultuře asi na polovinu, nebo které ještě zřetelně redukuje hemadsorpci.

Součástí titračního pokusu jsou vyšetření referenčních vzorků a soustava kontrol.

Vedle využití ve virologické diagnostice /izolace viru, stanovení infekční nebo virusinhibující aktivity např. protilátek/ se může nový postup uplatnit i při pomnožování virových agens pro výrobní účely; nelze vyloučit ani jeho využití mimo oblast virologie při sledování biologického účinku pomalu působících látek neinfekčního charakteru.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy testovacího systému buněčných nebo tkáňových kultur pro stanovení virů nebo viry inhibujících látek, vyznačující se tím, že se testovaný materiál inokuluje v jedné operaci současně s buňkami pro nárůst kultury s užitím Eaglova minimálního esenciálního média, v němž je glukóza nahražena galaktózou v množství 0,5 až 1,5 g na litr média a pyrohroznanem sodným v množství 0,25 až 0,75 g na 1 litr média, o pH 7,0 až 7,8, s inkubací po dobu 4 až 21 dní při teplotě 30 až 40 °C.