



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 199 085

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 14 09 77
(21) PV 5988-77

(11) (B1)

(51) Int. Cl. C 12 K-9/00

N5/00 770

(40) Zveřejněno 17 09 79
(45) Vydáno 30 09 82

(75)
Autor vynálezu IZBICKÝ ALEXEJ MUDr. CSc.
FRÖHLICHOVÁ SVĚTLANA, PRAHA

(54) Způsob přípravy kultur buněk psích ledvin vhodných k pomnožení viru parotitidy

1

Vynález se týká způsobu přípravy buněčných kultur, u něhož se řeší otázka zlepšení podmínek kontrolního vyšetření jejich kvality a otázka zvýšeného efektu pomnožení virového agens.

Jednou ze základních podmínek uspokojivého výsledku reprodukce viru je vyhovující kvalita buněčných kultur. Podle dostupných literárních údajů i dosavadní běžné praxe se k pomnožování při výrobě nebo provozu užívá kultur v období prvního až sedmého dne po nasazení buněk (viz např. Lennette E.H. et al., Laboratorní metody vyšetřovací virových a rickettsiálních nákaz, Avicenum, Praha, 1974), výjimečně desátého až dvanáctého dne (Činátl J. et al., Tkáňové a buněčné kultury, SZN, Praha, 1968, str. 144) po nasazení. Tato, poměrně krátká doba celkové inkubace před infikováním může postačit k rozpoznání hrubých kvalitativních nedostatků kultur, avšak ke konečnému posouzení jejich vhodnosti pro náročnější účely je zpravidla zapotřebí delšího časového období. Čím později jsou eventuelní závady zjištěny, tím větší materiální i časové ztráty mohou vzniknout, úměrně i významu sledovaného cíle (např. příprava větší šarže očkovací látky).

Běžným požadavkem pomnožování mikrobiálního inokula je získání materiálu o co nejvyšším obsahu infekčního agens (např. pro přípravu žádaného produktu), anebo - při

využití v diagnostice - pomnožení infekčního inokula postačující ke spolehlivému odečtení testu. V některých systémech buněčná kultura-virus může být dosažení uspokojivého výsledku obtížné, jak jsme zjišťovali i v případě pomnožování některých atenuovaných kmenů viru parotitidy v primárních kulturách buněk psích ledvin.

U dosud známých postupů pomnožování virového agens v buněčných kulturách tedy 1) může docházet k ekonomickým ztrátám zaviněným zahájením práce na nevhodných buněčných kulturách, 2) není, alespoň v některých případech, dosahováno optimálního pomnožovacího efektu.

Oba výše uvedené nedostatky, přinejmenším v případě pomnožování kmene Jeryl Lynn viru parotitidy v primárních kulturách buněk psích ledvin, je možno odstranit novým řešením, jehož podstata spočívá v užití dodatečně, respektive prolongovaně inkubovaných kultur.

Nový způsob vychází ze studia přípravy živé očkovací látky proti příušnicím, z výsledků získaných za experimentálních podmínek, kdy infekční inokulum (atenuovaný kmen Jeryl Lynn) bylo aplikováno na primární kultury buněk psích ledvin dodatečně (po nárůstu buněk v kultivační nádobě, bez výměny média) inkubovaných, zpravidla při teplotě $+25^{\circ}\text{C}$ po dobu tří týdnů.

Toto období dodatečné inkubace poskytuje (proti dosud běžnému postupu infikování kultur 5 až 7 dní po nasazení) pro kontrolní účely navíc 21 dní (podle výsledků orientačních pokusů však není vyloučena možnost dalšího prodloužení - sledováno 35 dní), což vytváří podmínky pro snížení eventuálních ztrát vzniklých vyřazováním nevyhovujících kultur z produkce.

Z dodatečně inkubovaných kultur byla (při stejné dávce infekčního inokula na jednu kultivační nádobu) získávána virová tekutina o titrech infekční aktivity významně vyšších než z kultur užitých dosavadním způsobem, v období 1. až 11. zisku byl průměrný rozdíl titru $1,7 \log \text{TKID}_{50}$, což představuje cca 50násobně vyšší množství získaného infekčního viru (sledováno při užití média s neomycinem, bez příměsí inaktivovaného telecího séra).

Mechanismus pozorovaného jevu nelze zatím objasnit. Zvýšení pomnožovacího efektu bylo pozorováno u kultur dodatečně inkubovaných při teplotách kolem $+25^{\circ}\text{C}$ po dobu od jednoho do pěti týdnů. Vedle teplotního a časového faktoru se zde mohou uplatňovat některé další vlivy, jako např. složení média, jeho pH apod.

Podle dostupné literatury nebyl nový způsob přípravy buněčných kultur při pomnožování viru parotitidy ani jiných virů dosud popsán, ani není autorům známo, že byl někde využíván.

Podstatou vynálezu je tedy způsob přípravy kultur buněk psích ledvin vhodných k pomnožení viru parotitidy spočívající v tom, že se kultury buněk psích ledvin po

nasazení v laktalbuminhydrolyzátovém médiu inkubují při teplotě od 35 do +38 °C po dobu potřebnou k nárůstu konfluentního monolayeru a potom se kultura dodatečně inkubuje v témž médiu při teplotě od +15 do +30 °C po dobu 7 až 28 dní.

Příklad konkrétního provedení vynálezu

Pomnožování atenuovaného kmene Jeryl Lynn viru parotitidy v primárních kulturách buněk psích ledvin.

Příprava a inkubace buněčných kultur:

Ve 150 ml růstového laktalbumin-hydrolyzátového média VEL (médiu Sevac III s příměsí 10 % inaktivovaného telecího séra, 1,2 ml roztoku 7,5 % NaHCO_3 na 100 ml média, 100 j. penicilinu a 100 μg streptomycinu na 1 ml média) je do jedné láhve podle Rouxe objemu 1200 ml (kultivační plocha stěny 220 cm^2) inokulována suspenze 10×10^6 trypsinovaných buněk psích (beagle) ledvin a lahve se v horizontální poloze inkubují stacionárně při teplotě +37 °C po době pěti až sedmi dnů, do vytvoření konfluentní buněčné vrstvy na stěně kultivační nádoby. Potom jsou kultury bez výměny média inkubovány ve stejné poloze při teplotě +25 °C po dobu tří týdnů (dodatková inkubace).

Infikování buněčných kultur a získání virové tekutiny:

Dodatkově inkubované kultury jsou infikovány virem příušnic (atenuovaný kmen Jeryl Lynn adaptovaný na buňky psích ledvin) v multiplicitě inokula 10^{-3} až 10^{-1} num log TKID₅₀ na jednu buňku, ve 100 ml čerstvého Parkerova média 199 původního složení (Morgan et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., N.Y., 73,1, 1950) s příměsí 5 % inaktivovaného telecího séra, 2,1 ml roztoku 7,5 % NaHCO_3 na 100 ml média, 100 j. penicilinu a 100 μg streptomycinu na jeden ml média. Pak se inkubují stacionárně při teplotě +34 °C, přičemž se získá virová tekutina, spojená s výměnou média (100 ml původního Parkerova média 199 bez příměsí telecího séra, s 2,1 ml roztoku 7,5 % NaHCO_3 na 100 ml média a s příměsí 25 μg Neomycinu B na jeden ml média), provádějí ve zvolených (např. jedno- až tří denních) intervalech.

Získaná virová tekutina s příměsí vhodného stabilizátoru (např. 1 % sacharózy, sorbitu, eventuálně lidského sérového albuminu) se do dalšího zpracování ukládá ve zmraženém stavu, nejlépe při -70 °C.

Stanovení titru infekční aktivity (TKID₅₀):

Test se provádí ve zkumavkových kulturách buněk heteroploidní linie Vero (10 replik na každé ředění vzorku, 10^{-n}) s odečítáním cytopatického efektu a hemadsorpce resp. hemaglutinace kuřecích erytrocytů.

S výhodou lze užít techniky inokulace vyšetřovaného vzorku (à 0,2 ml) do suspenze buněk (300 tisíc buněk v 1,3 ml média na jednu zkumavku) v modifikovaném Eagleově minimálním esenciálním médiu s galaktozou a natrium pyruvátém (Baugh C.L. et al., Life Science, 6, 371, 1967; Slonim D., J. Biol. Standardization, 2, 51, 1974; Izbický A.,

Zprávy SEVAC, č. 3, 81 až 89, 1974) s desetidenní stacionární inkubací v šikmé poloze při $+37^{\circ}\text{C}$, bez výměny média.

Po skončení inkubace se do zkumavkových kultur přidá (po 0,2 ml na zkumavku s 1,5 ml média) suspenze třikrát promytých 3% kuřecích erytrocytů v roztoku PBS (Dulbecco, Vogt, J. exp. Med., 99, 167 až 182, 1954) bez Ca^{++} a Mg^{++} , zkumavky se po důkladném protřepání inkubují 30 minut při $+37^{\circ}\text{C}$ a potom při laboratorní teplotě do vytvoření sedimentu v kontrolních zkumavkách. Sleduje se aglutinace krvinek a mikroskopicky výskyt hemadsorpce a cytopatického efektu. Vypočtené hodnoty TKID_{50} (Reed L.J., Muench H., Amer. J. Hyg., 27, 493, 1938) se vyjadřují v negativních $\log_{10}$.

Nové řešení bylo zatím sledováno především s hlediska pomnožování některých atenuovaných kmenů virů parotitidy na primárních kulturách buněk psích ledvin, pokud však zvýšený pomnožovací efekt není vázán výlučně na některou zvláštní charakteristiku uvedeného systému, není vyloučeno, že se uplatní i při pomnožování jiných virových agens nebo na jiných typech buněčných kultur.

Výrazným kladem shora uvedeného příkladu nového řešení je vysoká efektivnost pomnožování viru (úspora buněčných kultur, médií, laboratorního skla, snížení pracnosti), jednoduchost provedení a možnost důkladného prověření kultur před začátkem výrobního procesu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy kultur buněk psích ledvin vhodných k pomnožení viru parotitidy, vyznačující se tím, že se kultury buněk psích ledvin po nasazení v růstovém laktalbumin-hydrolyzátovém médiu inkubují při teplotě od $+35$ do $+38^{\circ}\text{C}$ po dobu potřebnou pro nárůst konfluentní buněčné vrstvy na stěně kultivační nádoby a potom se kultura inkubuje v témž médiu při teplotě od $+15$ do $+30^{\circ}\text{C}$ po dobu 7 až 28 dní.