



УКРАЇНА

(19) UA (11) 44112 (13) U
(51) МПК (2009)
C12N 5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВПЛИВУ НА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ВІРУСІВ КОКСАКІ В-1

1

(21) u200900257

(22) 14.01.2009

(24) 25.09.2009

(46) 25.09.2009, Бюл. № 18, 2009 р.

(72) ЗАДОРЖНА ВІКТОРІЯ ІВАНІВНА, ФРОЛОВ
АРКАДІЙ ФЕДОРОВИЧ, ЗУБКОВА НАТАЛІЯ ЛЕО-
НІДІВНА, БУРА ТАМАРА ОЛЕКСАНДРІВНА, БОН-
ДАРЕНКО ВАЛЕНТИНА ІВАНІВНА, ВЕДМЕДЕНКО
ВАЛЕНТИНА ВОЛОДИМИРІВНА, ГАЛАГУЗА ЮРІЙ
ПЕТРОВИЧ

(73) ЗАДОРЖНА ВІКТОРІЯ ІВАНІВНА, ФРОЛОВ
АРКАДІЙ ФЕДОРОВИЧ, ЗУБКОВА НАТАЛІЯ ЛЕО-

2

НІДІВНА, БУРА ТАМАРА ОЛЕКСАНДРІВНА, БОН-
ДАРЕНКО ВАЛЕНТИНА ІВАНІВНА, ВЕДМЕДЕНКО
ВАЛЕНТИНА ВОЛОДИМИРІВНА, ГАЛАГУЗА ЮРІЙ
ПЕТРОВИЧ

(57) Спосіб впливу на біологічні властивості вірусів
Коксаки В-1, що включає культивування на пере-
щеплювальних культурах клітин, який **відрізня-**
ється тим, що культивування проводять під дією
штучного геомагнітного потоку різної направленос-
ті, що призводить до зміни інфекційної активності
вірусу та маркуючої ознаки rcL_{40} .

Спосіб відноситься до області вірусології і мо-
же використовуватися для зміни біологічних влас-
тивостей ентеровірусів, визначення залежності
між гено- та фенотиповими ознаками ентеровіру-
сів, розробки діагностичних тест-систем, прове-
дення наукових та діагностичних досліджень.

Відомий спосіб (1, 2) вирощування вірусів Кок-
сакі В-1 на перещеплюваних культурах клітин НЕР-
2, Hela, KB, HLS і FL не дозволяє впливати на їх
біологічні властивості та отримувати віруси з різ-
ними фенотиповими ознаками для проведення
наукових досліджень та розробки діагностичних
препаратів.

В основу корисної моделі поставлене завдан-
ня знайти новий спосіб впливу на біологічні влас-
тивості ентеровірусів.

Поставлене завдання вирішують шляхом ви-
рощування вірусів Коксакі В-1 на перещеплюваль-
ній культурі клітин НЕР-2 під дією магнітної індукції
різної направленості.

Приклад 1. Здійснення способу та інфекційна
активність вірусу.

Для здійснення способу беруть штам вірусу
Коксакі В-1 (штам №1202, виділений із фекалій
здорової дитини, м. Харків) з Музею патогенних
для людини мікроорганізмів ДУ "Інститут епідеміо-
логії та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевсько-
го АМН України". Штам підтримують пасажами на
культурі клітин НЕР-2 в умовах термостату при
температурі 36°C та вологості повітря 40-70%. Для
вирощування перещеплювальної культури клітин

використовують поживні середовища №199 та Ігла
MEM (1:1). Як стимулятор росту культури клітин
використовують ембріональну сироватку великої
рогатої худоби.

Як джерело магнітної індукції використовують
гексоферит-барієві диски марки 2БА1 (6БИ240) ф
22мм, діаметром 20-22мм, товщиною 2-3мм, з ін-
тенсивністю магнітної індукції на північній поверхні
(N) одного диску (15,9±0,12)нТл, на південній (S) -
(15,2±0,12)нТл. Два диски південної полярності
при відстані у 0,2мм від об'єкта їх дії забезпечують
щільність магнітної індукції у (31,3±0,5)нТл, північ-
ної - (29,92±1,4)нТл.

Для використання гексоферит-барієвих дисків
їх приєднують до поверхні стандартних 96-
лункових полістеролових планшетів, в яких про-
водять культивування клітин. На одну планшету при-
кріплюють гексоферит-барієві диски однієї поляр-
ності. Гексоферит-барієві диски щільно кріпляться
відповідною поверхнею (південною чи північною)
за допомогою клейкої плівки згідно зі схемою
(Фіг.1) до поверхні стандартних 96-лункових план-
шетів для культивування клітин. Одну планшету з
культурою клітин НЕР-2 піддають дії магнітного
потoku. По одній планшеті використовують для
контролю клітин НЕР-2 та контролю вірусу (не під-
лягають дії магнітного потоку).

Культуру клітин інфікують. Усі операції із за-
раження культур клітин виконують у захисному
укритті (клас безпеки 2).

UA (11) 44112 (13) U

Кожне розведення вірусу вносять по 0,1мл в лунки планшети з культурою клітин, по 4 лунки на кожне розведення. Заражені і контрольні клітинні культури інкубують при температурі 37°C у CO₂-інкубаторі з вмістом 5% вуглекислого газу протягом 7-ми діб. Облік результатів проводять щоденно за появою цитопатогенної дії у культурі клітин. Титр вірусу розраховують за методом Кербера [2, 3].

У дослід беруть вірус Коксакі В-1 у концентрації $10^{1,0}-10^{8,0}$ ТЦД₅₀/0,1мл. Магнітне навантаження становило 16 та 32нТл на північному та південно-полюсах. Після культивування вірусу на пере-

щеплювальній культурі клітин НЕР-2 при температурі 36°C та зазначених параметрах магнітного потоку проводять титрацію вірусомісткого матеріалу з лунок планшети з відповідними концентраціями вірусу, які в досліді виявилися останніми щодо розвитку цитопатогенної дії.

Інфекційна активність вірусу Коксакі В-1 при його культивуванні під впливом південного полюса магніту при силі магнітного навантаження 16мТл становила $6,0 \pm 0,21 \text{ IgTЦД}_{50}/\text{мл}$, при 32мТл - $7,5 \pm 0,21 \text{ IgTЦД}_{50}/\text{мл}$ (табл. 1).

Таблиця 1

Інфекційна активність вірусу Коксакі В-1 за умов впливу магнітного потоку різного навантаження

Рівень магнітного навантаження	Полюс магніту	Інфекційна активність вірусу під впливом магнітного потоку	
		IgTЦД ₅₀ /мл	±m
16нТл	південь	6,0	0,20
32нТл	південь	7,5	0,21
16нТл	північ	7,5	0,20
32нТл	північ	9,0	0,20
-	контроль	9,0	0,20

При культивуванні вірусу на північному полюсі при силі магнітного навантаження в 16нТл інфекційна активність вірусу становила $7,5 \pm 0,20 \text{ IgTЦД}_{50}/\text{мл}$, що вірогідно відрізняється від показника контролю у бік зниження понад 0,5 IgTЦД₅₀/1мл. Під впливом північного полюса при силі магнітного навантаження в 32мТл інфекційна активність вірусу Коксакі В-1 була такою ж, як і в контролі вірусу, який не піддавався дії магнітного потоку.

Приклад 2. Маркуюча ознака rct₄₀ (здатність до репродукції ентеровірусів при температурі +40°C).

Для визначення маркуючої ознаки rct₄₀ проводять паралельно титрування вірусів при 36°C та

40°C на перещеплювальній клітинній культурі НЕР-2.

Ознаку rct₄₀ вважають позитивною (rct₄₀+) при різниці в інфекційному титрі при 36°C та 40°C в 2 IgTЦД₅₀ і менше, (rct₄₀-) - негативною при 5 IgTЦД₅₀ і більше. При інших значеннях IgTЦД₅₀ вважається проміжною (rct₄₀±). $5 > \text{IgTЦД}_{50}/1,0\text{мл}$ - низьковірулентний, $>2 - <5$ - з проміжними властивостями, $2 < -$ вірулентний) [1].

Для визначення маркуючої ознаки rct₄₀ в контролі використовують вірусомістку рідину з лунки, де початкова концентрація вірусу становить $10^3 \text{ ТЦД}_{50}/0,1\text{мл}$. Результати визначення приведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Визначення маркуючої ознаки rct₄₀ при культивуванні вірусу Коксакі В-1 за умов впливу магнітного потоку різного навантаження

Рівень магнітного навантаження	Полюс магніту	Інфекційна активність вірусу після впливу магнітного потоку при 36°C		Інфекційна активність вірусу після впливу магнітного потоку при 40°C		Різниця IgTЦД ₅₀ /мл	Ознака rct ₄₀
		IgTЦД ₅₀ /мл	±m	IgTЦД ₅₀ /мл	±m		
16нТл	південь	7,0	0,20	<4,5	0,21	>2,5	±
32нТл	південь	8,5	0,20	6,5	0,20	2,0	+
16нТл	північ	12,0	0,23	<4,5	0,20	>7,5	-
32нТл	північ	9,5	0,21	7,5	0,21	2,0	+
-	контроль	11,5	0,20	5,5	0,20	6,0	-

Із даних таблиці 2 видно, що в контрольних дослідженнях штама має ознаку „-“ (інфекційна активність вірусу Коксакі В-1 при культивуванні при температурі 36°C становить $11,5 \pm 0,20 \text{ IgTЦД}_{50}/\text{мл}$, при 40°C - $5,5 \pm 0,20 \text{ IgTЦД}_{50}/\text{мл}$). Під впливом магнітного навантаження в 32нТл незалежно від полюсу магніту вірус набув підвищену здатність до

розмноження при температурі 40°C (різниця в титрах інфекційної активності становить 2,0 IgTЦД₅₀/мл), тобто має ознаку „+“. Навпаки, при культивуванні при 16нТл на північному полюсі ця здатність зменшується нижче показника контролю - різниця в титрах інфекційної активності становить $>7,5 \text{ IgTЦД}_{50}/\text{мл}$, тобто вірус набуває ознаки „-“.

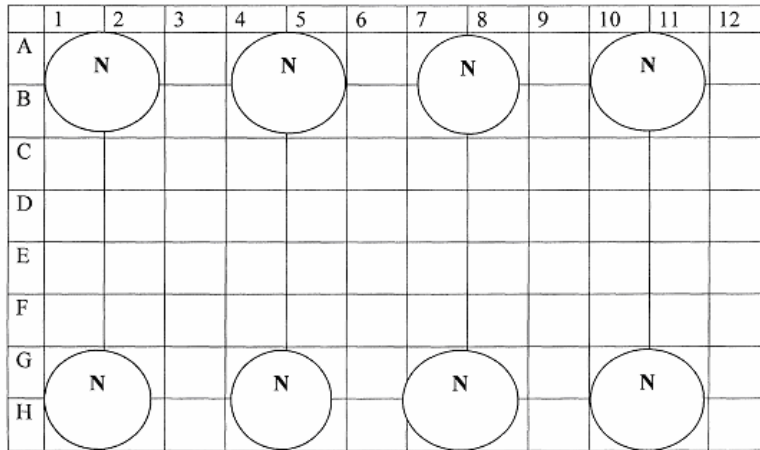
Таким чином, запропонований корисною моделлю спосіб впливу на біологічні властивості вірусів Коксаки В дозволяє отримувати віруси зі зміненими інфекційною активністю та маркуючою ознакою gst_{40} .

Література

1. Ворошилова М.К. Энтеровирусные инфекции человека. - М.: Медицина, 1979.-300с.

2. Ворошилова М.К., Жевандрова В.И., Балаян М.С. Методы лабораторной диагностики энтеровирусных инфекций. - М.: Медицина, 1964. - 152с.

3. Руководство по вирусологическим исследованиям полиомиелита // Глобальная программа по вакцинации и иммунизации. РПИ. ВОЗ. - Женева.: Москва, 2005. - 112с.



Кріплення гексоферит-барієвих дисків до поверхні стандартних 96-лункових планшетів для культивування клітин (на прикладі дисків північної полярності)

Fig.1