

## Разработка способа криоконсервирования вируса болезни Марека

UDC 57.043;578.71

M.YU. STEGNIY<sup>1\*</sup>, B.T. STEGNIY<sup>1</sup>, A.N. GOLTSEV<sup>2</sup>

## Developing of Cryopreservation Method of Marek's Disease Virus

Разработан способ консервирования вируса болезни Марека, который заключается в применении двухэтапного режима замораживания до  $-30^{\circ}\text{C}$  со скоростью 1 град/мин; от  $-30$  до  $-70^{\circ}\text{C}$  со скоростью 5–10 град/мин с последующим погружением в жидкий азот ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) в таком составе защитной среды: 80% питательной среды 199 с добавлением 10% инактивированной сыворотки крови крупного рогатого скота и 10% диметилсульфоксида.

**Ключевые слова:** консервирование вируса болезни Марека, вакцина.

Розроблено спосіб консервування вірусу хвороби Марека, що полягає в застосуванні двохетапного режиму заморожування до  $-30^{\circ}\text{C}$  зі швидкістю 1 град/хв; від  $-30$  до  $-70^{\circ}\text{C}$  зі швидкістю 5–10 град/хв з наступним зануренням у рідкий азот ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) у такому складі захисного середовища: 80% живильного середовища 199 з додаванням 10% інактивованої сироватки крові великої рогатої худоби і 10% диметилсульфоксиду.

**Ключові слова:** консервування вірусу хвороби Марека, вакцина.

The cryopreservation method, consisting in application of two-stage freezing regimen down to  $-30^{\circ}\text{C}$  with  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  rate, from  $-30$  down to  $-70^{\circ}\text{C}$  with  $5\text{--}10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  rate with following plunging into liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) at that composition of protective media 199 nutrient media 80% with adding of inactivated serum of cattle blood 10% and dimethyl sulfoxide 10% has been developed for Marek's disease virus.

**Key-words:** cryopreservation of Marek's disease virus, vaccine.

Болезнь Марека (БМ) – это высококонтагиозное заболевание кур и индеек. Существует 2 формы течения болезни: первая, классическая – характеризуется поражением периферической и центральной нервной системы; вторая, острая – лейкозом и образованием лимфоидных опухолей. В 1961 году болезнь получила название по имени профессора Королевского Венгерского университета Ж. Марека, которым впервые была описана. До применения вакцинопрофилактики БМ наносила громадный экономический ущерб во всех странах мира. Вирусная природа болезни была доказана в 1967 г.

Возбудитель БМ (ВБМ) относится к семейству герпес-вирусов с кубическим типом симметрии и формой икосаэдра [1]. Вирус имеет три серотипа: к первому относятся вирусы, способные вызывать лимфомы у птиц, а также аттенуированные его варианты. Природноослабленные неонкогенные вирусы БМ второго серотипа обладают протективными свойствами, поэтому используются как усиливающие иммунный ответ компоненты в бивалентных вакцинах [2]. Третий серотип ВБМ пред-

ставлен антигенно родственными вирусами герпеса индеек. Основой профилактики БМ является вакцинация бивалентными, поливалентными гетерологичными живыми вакцинами [4]. В лаборатории биотехнологии НИЦ “ИЭКВМ” была создана бивалентная культуральная живая вакцина против болезни Марека из производственных штаммов герпес-вируса кур SBG 2-го серотипа и герпес-вируса индеек FC-126 3-го серотипа (регистрационное свидетельство №1314-04-0188-05 от 18 октября 2005 г). Поскольку ВБМ является клеточно-связанным, антигенные и иммуногенные свойства живой вирус-вакцины зависят от жизнеспособности клеток, в которых репродуцируется вирус.

Цель исследований – разработать оптимальную систему криоконсервирования и хранения компонентов вирус-вакцины против БМ в жизнеспособной клетке.

### Материалы и методы

Для накопления биомассы ВБМ использовали первично трипсинизированную клеточную куль-

<sup>1</sup>Национальный научный центр “Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины”, г. Харьков

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Пушкинская, 83, г. Харьков, Украина 61023; тел.:+38 (057) 707-20-38, электронная почта: stegniy@vet.kharkov.ua

<sup>1</sup>National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 83, Pushkinskaya str., Kharkov, Ukraine 61023; tel.:+380 57 707 2038, e-mail: stegniy@vet.kharkov.ua

туру, полученную из 10–11-суточных куриных эмбрионов (КЭ). Культивирование клеток осуществляли по стандартной методике [5, 7] в смеси равных объемов среды 199 и среды Игла с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота (к.р.с.). Заражение клеточного монослоя проводили по методу [5]. Культивирование инфицированных вирусом клеток осуществлялось в поддерживающей среде того же состава, но с 2% сыворотки к.р.с. В работе использовали производственные штаммы SBG, вируса второго серотипа (Gallid herpesvirus type 2), FC-126 третьего серотипа (Turkey herpesvirus type 3), контрольный штамм JM (Gallid herpesvirus type 1) болезни Марека.

Сохранность системы вирус-клетка контролировали методом суправитального окрашивания трипановым синим в камере Горяева [10]. Для повышения сохранности и жизнеспособности криоконсервированных клеток применяли криопротектор димексид в конечных концентрациях от 2 до 10%. Инфицированные клетки криоконсервировали в криопробирках фирмы Nunk объемом 4–4,5 мл на программном замораживателе производства СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины. Инфекционную активность ВБМ определяли титрованием на культуре клеток КЭ в культуральных матрасах емкостью 50 см<sup>3</sup>. При этом заражение проводили в объеме 0,5 см<sup>3</sup> каждого десятикратного разведения вируса на 4–5 флаконов монослоя клеток по стандартной методике [5]. После этого инфицированную культуру инкубировали при температуре 39°C в течение 4–5 суток со сменой поддерживающей среды. По истечении 4–5 суток после инфицирования монослой отмывали 0,5% раствором уксусной кислоты с последующим окрашиванием 0,1% раствором амидового черного. Титр инфекционной активности вируса определяли по среднему числу образовавшихся фокусов (ФОЕ):  $T = (XФ1 + XФ2 + XФ3) \times P / N$ , где XФ – количество фокусов, подсчитанных в каждом матрасе с клетками, зараженными определенным разведением вируса; P – разведение вируса; N – количество использованных для подсчета емкостей.

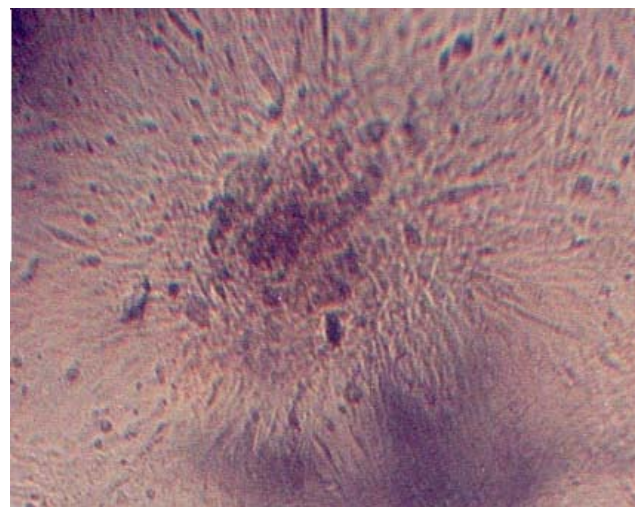
### Результаты и обсуждение

Как показали немногочисленные исследования возможности криоконсервирования инфицированных вирусом клеток для биотехнологии [6], разработка оптимальных способов этого процесса усложняется из-за суммирования криоповреждений системы вирус-клетка и повреждений, полученных клетками в процессе внутриклеточной репродукции вируса. Существенное значение при этом имеют скорость, с которой осуществляют замораживание, конечная температура криоконсервирования и последующего хранения, выбор

криопротектора и обработка оптимальной концентрации его применения. Анализ данных литературы показал, что для криоконсервирования перевиваемых клеточных линий с успехом применяют в качестве криопротектора димексид или самостоятельно, или как компонент в смеси криопротекторов [3, 8].

Штаммы SBG и FC-126 активно размножались в первичной культуре клеток КЭ, проявляя при этом цитопатический эффект в виде образования характерных фокусов, состоящих из округлых клеток (рисунок). После явного проявления цитопатического эффекта монослой снимали со стекла смесью раствора версена с трипсином с последующим добавлением поддерживающей среды; центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, а осадок ресуспендировали в защитной среде. Затем расфасовывали в криопробирки и охлаждали на программном замораживателе с применением быстрой со скоростью 300–400 град/мин (путем прямого погружения в жидкий азот) и двухступенчатой программ: от температуры 4°C до –30°C со скоростью 1 град/мин; от –30 до –70°C со скоростью 5–10 град/мин с последующим погружением в жидкий азот (–196°C).

В качестве сред криоконсервирования использовали: поддерживающую среду; поддерживающую среду с добавлением 10% димексида; питательную среду 199 с добавлением 10% инактивированной сыворотки крови к.р.с. и 10% димексида. Эффективность применяемых режимов криоконсервирования и криозащитных сред оценивали по сохранности клеток и инфекционной активности вируса. Если сохранность клеток не превышала 30%, данные криозащитные смеси и режимы замораживания не считали удовлетворительными. Исходная концентрация инфицированных вирусом клеток в криопробирках составляла 5–6 млн/см<sup>3</sup>.



Цитопатический эффект ВБМ в первичной культуре клеток эмбрионов куриных фибробластов.

**Инфекционная активность вакцинных штаммов ВБМ и сохранность инфицированных клеток ФЭК, криоконсервированных с применением двухэтапного режима замораживания**

Название штамма ВБМ	Сохранные клетки после размораживания, %	Титр инфекционной активности ВБМ до замораживания, ФОЕ/см <sup>3</sup>	Титр инфекционной активности после размораживания, ФОЕ/см <sup>3</sup>
SBG	42,7±0,75	4×10 <sup>6</sup>	11893±1,17
	43,7±1,25	4×10 <sup>6</sup>	11889±1,25
	47,2±1,25	6×10 <sup>6</sup>	11880±1,25
	41,2±1,25	5×10 <sup>6</sup>	11846±1,25
FC-126	84,7±1,40	5,3×10 <sup>6</sup>	3640±1,25
	78,4±1,47	5,3×10 <sup>6</sup>	3690±1,25
	77,8±1,47	5,5×10 <sup>6</sup>	3600±1,25
	80,3±1,40	3,3×10 <sup>6</sup>	3679±1,17

**Примечание:** уровень значимости –  $p < 0,005$ .

Результаты проведенных экспериментов показали, что применение быстрой программы криоконсервирования с использованием поддерживающей среды и поддерживающей среды с добавлением 10% димексида не обеспечивало сохранности инфицированных клеток выше 30%. Максимальная сохранность инфицированных клеток, криоконсервированных с применением быстрой программы и среды консервирования, включающей 199 питательную среду с добавлением 10% инактивированной сыворотки крови к.р.с. и 10% димексида, составляла 33,7%. В таблице представлены данные, полученные в результате проведенных экспериментов с применением двухступенчатой программы замораживания и вышеупомянутой криозащитной среды, включающей 10% инактивированной сыворотки крови к.р.с. и 10% димексида. Применение димексида в концентрации 15% в составе той же криозащитной среды вызывало тенденцию снижения инфекционной активности вируса. Как видно из данных таблицы, применение двухэтапного режима замораживания и среды консервирования, включающей 199 питательную среду с добавлением 10% инактивированной сыворотки крови к.р.с. и 10% димексида, позволяет получить сохранность инфицированных клеток (не ниже 40%), которая обеспечивает инфекционную активность вакцинных штаммов ВБМ согласно ТУ У 24.4-00497087-015:2005.

### Выводы

Разработан способ консервирования вируса болезни Марека (декларативный патент на полезную модель [9]), который заключается в применении двухэтапного режима замораживания: до  $-30^{\circ}\text{C}$  со скоростью 1 град/мин; от  $-30$  до  $-70^{\circ}\text{C}$  со

скоростью 5–10 град/мин с последующим погружением в жидкий азот ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) в таком составе защитной среды: 80% питательной среды 199, 10% инактивированной сыворотки крови к.р.с. и 10% диметилсульфоксида.

### Литература

1. *Криоконсервирование клеточных суспензий* / Под общ. ред. А.А. Цуцаевой и др. – Киев: Наук. думка, 1983. – 240 с.
2. *Лукина В.А., Соловьёв Б.В., Быкова Н.Н.* Современное состояние и перспективы вакцинопрофилактики болезни Марека // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов: Тезисы докладов. – Щёлково, 2000. – С. 6–8.
3. *Лярски З.* Диагностика вирусных болезней животных / Под ред. В.Н. Сюрин. – М.: Колос, 1980. – 399 с.
4. *Самуйленко А.Я., Непоклонов Е.А., Соловьёв Б.В.* Инфекционная патология животных. Т. 1. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – 1911 с.
5. *Сергеев В.А., Собко Ю.А.* Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии. – Киев: Урожай, 1993. – 151 с.
6. *Стегний Б.Т.* Сравнительное изучение криозащитного эффекта различных криопротекторов для культур и тканей // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии: Тезисы доклада научной конференции. – Владимир, 1986. – С. 50–52.
7. *Стегний М.Ю., Дикий И.Л., Стегний Б.Т.* Особенности криоконсервирования клеток, инфицированных вирусами // Экспериментальна і клінічна медицина. – 1999. – №2. – С. 111–113.
8. *Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьёв Б.В.* Вирусные болезни животных. – М., 1998. – 928 с.
9. *Фреши Р.* Культура животных клеток: Методы. – М.: Мир, 1989. – 332 с.
10. *Патент України на к/м № 4912, МПК<sup>7</sup> C12 N7/00.* Спосіб консервування вірусу хвороби Марека / М.Ю. Стегній, Б.Т. Стегній, О.В. Заремба. Заявлено 24.05.04; Опубл. 15.02.2005. – Бюл. №2.

Поступила 22.08.2008