

УДК 57.043:57.086.13:57.013:57.02:001.891:578.825.1

**БІОБЕЗПЕЧНІ ТЕХНОЛОГІЇ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ТА ЗБЕРЕЖЕННЯ ВІРУСІВ
І ВІРУСОВМІСНОГО МАТЕРІАЛУ В УМОВАХ КРІОБАНКУ ННЦ «ІЕКВМ»****Стегній М. Ю.**

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, e-mail: stegniy@vet.kharkov.ua

У статті розкрито етапи розробки сучасних біобезпечних технологій кріоконсервування та збереження вірусів і вірусовмісного матеріалу в умовах кріобанку, що складаються з розробки біологічно безпечної упаковки вилученого вірусовмісного біологічного діагностичного матеріалу, біологічно безпечної технології доставки та наступного збереження в умовах кріобанку вірусного матеріалу та біобезпечних технологій кріоконсервування, збереження та відтаювання вірусних патогенів. Дослідження з розробки біобезпечних умов і режимів кріоконсервування та відтаювання на прикладі ВХМ показали, що найбільш оптимальним є застосування двоетапного режиму заморожування й середовища консервування, що включає живильне середовище 199 з додаванням 10 % інактивованої сироватки крові (ВРХ) і 10 % дімексиду, дозволяє одержати належну схоронність інфікованих клітин, що забезпечує збереженість ультраструктури та інфекційної активності вірусів за контактного способу відтаювання за швидким режимом (за температури 37 °С) з використанням в якості теплоносіїв дезінфікуючих розчинів.

Ключові слова: біологічно безпечні технології, кріоконсервування, збереження, вірус хвороби Марека, віруси.

Вилучені під час спалахів інфекційних захворювань штами вірусів входять до складу Колекції патогенів ННЦ «ІЕКВМ», що становить Національне надбання, і повинні зберігатись у кріобанку для подальшої роботи по вивченню їх біологічних властивостей та отриманню з них імунобіологічних препаратів – вакцин, діагностиків та ін. У зв'язку із цим актуальною проблемою стала розробка біобезпечних систем зберігання вірусних штамів збудників першої, другої та третьої груп патогенності для запобігання витоку інфекційного біологічного матеріалу в навколишнє середовище та впровадження світових стандартів біобезпеки і біозахисту з метою запобігання поширенню збудників зоонозів і зооантропонозів.

Сучасні вимоги належної лабораторної та виробничої практики (GLP, GMP) у наукових і діагностичних установах гуманної та ветеринарної медицини, які працюють з біологічними матеріалами, що представляють епідемічну чи епізоотичну небезпеку, тісно переплітаються з поняттями біобезпеки та біозахисту [2, 6, 7].

Біобезпечні технології кріоконсервування та збереження вірусів і вірусовмісного матеріалу в умовах кріобанку складаються по-перше: з розробки біологічно безпечної упаковки вилученого вірусовмісного біологічного діагностичного матеріалу, по друге: з розробки біологічно безпечної технології доставки та наступного збереження в умовах кріобанку вірусного матеріалу, по третє: з розробки біобезпечних технологій кріоконсервування, збереження та відтаювання вірусних патогенів.

Мета роботи. Розробити біобезпечні технології кріоконсервування та збереження вірусів і вірусовмісного матеріалу в умовах кріобанку.

Матеріали та методи. Для розробки біологічно безпечної упаковки вилученого вірусовмісного біологічного діагностичного матеріалу дослідження проводились на моделі вірусу хвороби Марека (ВХМ), який відноситься до збудників другої групи патогенності. Матеріал для індикації ВХМ відбирали від птиці з клінічними ознаками ХМ, яку забували з діагностичною метою, або користувалися патологічним матеріалом від щойно загиблої птиці.

Найбільш придатним матеріалом для вірусологічних досліджень є цільна гепаризована кров, яку відбирають у стерильні пробірки з яремної вени. Для цього птицю фіксують у положенні головою вниз, ножицями зрізують пір'я з латеро-вентральної поверхні шиї, шкіру протирають ватним тампоном, змоченим спиртом, розрізають шкіру стерильними ножицями в каудо-краніальному напрямку. Далі знаходять вену, її розрізають ножицями і збирають кров до пробірки в яку заздалегідь вносять 1–2 краплі гепарину. В одну пробірку набирають не більше 3–5 мл, щоб попередити згортання крові. При розтині відбирають селезінку, печінку або фабрицієву бурсу.

Для виділення вірусу з епітеліальної тканини пульпи з трупа птиці висмикують 25–50 махових пір'їн з крила чи зі спини, ножицями зрізують колодочки. В якості кріоконтейнерів випробовували скляні ампули, поліпропіленові контейнери із кришками, що загвинчуються та силіконовими прокладками, або полістиролові флакони із кришками, що нагвинчуються та полістиролові трубки, які запаюються. Крім того для вірусовмісного клітинного матеріалу використовують металеві контейнери із нержавіючої сталі [1]. Кріоконтейнери занурювали у рідкий азот. Відібраний патологічний матеріал доставляли для дослідження в посудини Д'юара.

Ефективність біобезпеки упаковки, що використовували при кріоконсервуванні, оцінювали згідно дотримання наступних вимог щодо біобезпеки упаковки: зведення до мінімуму людського фактору при герметизації, надійності, зносостійкості та кратності використання.

Для напрацювання біомаси ВХМ виготовляли первинно - трипсинізовану клітинну культуру фібробластів ембріонів курей (ФЕК), отриману з 10–11-добових курячих ембріонів. Культивування клітин здійснювали за стандартною методикою [1,3,5] у суміші рівних об'ємів середовища 199 та Ігла з додаванням 10 % сироватки крові великої рогатої худоби (ВРХ). Зараження клітинного моношару проводили за стандартною методикою [1]. Культивування інфікованих вірусом клітин здійснювали у підтримуючому середовищі того ж складу, але з 2 % сироватки (ВРХ). У роботі використовували виробничі штами SBG (Gallid herpesvirus type 2) вірусу другого серотипу, FC-126 (Turkey herpesvirus type 3), атенуйовані ізоляти 3/11; 4/11; 5/11 ВХМ першого серотипу (Gallid herpesvirus type 1) хвороби Марека. Усі перелічені віруси з колекції лабораторії біотехнології ННЦ «ІЕКВМ». Збереженість системи вірус-клітина контролювали за методом суправітального фарбування трипановим синім у камері Горяєва [5]. Для підвищення схоронності й життєздатності кріоконсервованих клітин застосовували кріопротектор діметилсульфоксид у кінцевих концентраціях від 2 до 10 %. Кріоконсервування інфікованих клітин здійснювали у кріопробірках фірми Nunc об'ємом 4,5 см³ на програмному заморозувачі виробництва СКТБ і ОП ІПК і К НАН України. Інфекційну активність ВХМ визначали титруванням на первинній культурі клітин фібробластів ембріонів курей (ФЕК), у культуральних флаконах ємністю 50 см³. При цьому зараження проводили в об'ємі 0,5 см³ кожним десятикратним розведенням вірусу на

4–5 флаконів моношару клітин за стандартною методикою [1]. Після цього інфіковану культуру інкубували за температури 39°C впродовж 4–6 діб зі зміною підтримуючого середовища. Облік ЦПД здійснювали на 3–4 (первинна генерація фокусів) та 6 добу після інфікування (вторинна генерація), після чого видаляли підтримуюче середовище, моношар фіксували 3 % розчином оцтової кислоти та фарбували 1 % водним розчином амідового чорного, підраховували кількість фокусів, індукованих вірусом. Титр інфекційної активності визначали по середньому числу фокусів, що утворилися (ФУО), використовуючи формулу:

$$T = (XФ1 + XФ2 + XФ3) / N \times P;$$

де T – титр інфекційної активності вірусу; XФ – кількість фокусів, підрахованих у кожному матраці із клітинами, зараженими певним розведенням вірусу; P – розведення; N – кількість використаних для підрахунку ємностей.

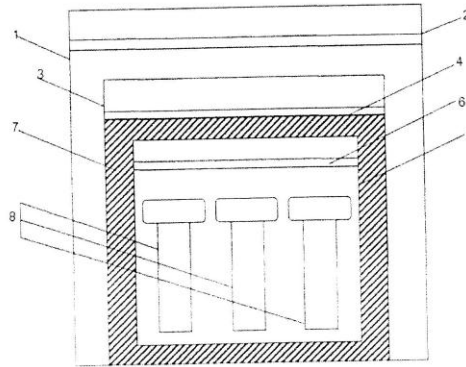
Штами SBG і FC-126, атенуйовані ізоляти 3/11; 4/11; 5/11 ВХМ першого серотипу вірусу хвороби Марека активно розмножувались у первинній культурі клітин курячих ембріонів (КЕ), проявляючи при цьому цитопатичний ефект у вигляді утворення характерних фокусів. Після явного прояву цитопатичного ефекту моношар знімали зі скла версен-тріпсиною сумішшю з наступним додаванням кріозахисного середовища. Потім розфасовували у кріопробірки й кріоконсервували на програмному заморозувачі із застосуванням швидкої (зі швидкістю 300–400° за хвилину) і двоступінчастої програм: від температури плюс 4 °С до мінус 30 °С зі швидкістю 1° за хв; від мінус 30 °С до мінус 70 °С зі швидкістю 5–10° за хв. з наступним зануренням у рідкий азот (мінус 196 °С).

Як середовище кріоконсервування використовували підтримуюче середовище; підтримуюче середовище з додаванням 10 % діметилсульфоксиду; живильне середовище 199 з додаванням 10 % інактивованої сироватки крові (ВРХ) і 10 % діметилсульфоксиду. Ефективність застосованих режимів кріоконсервування кріозахисних середовищ оцінювали по схоронності клітин та інфекційній активності вірусу. У тому випадку, якщо схоронність клітин не перевищувала 30 %, дані кріозахисні суміші й режими заморожування не вважали задовільними. Вихідна концентрація інфікованих вірусом клітин у кріопробірках становила від 5 до 6 млн/см³. Збереженість ультраструктури вірусів вивчали за допомогою електронного мікроскопу за методом негативного контрастування.

Результати досліджень. Вимоги, які пред'являються до ємностей для кріоконсервування це: забезпечення належної герметичності протягом усіх маніпуляцій при кріоконсервуванні; біологічна інертність; висока теплопровідність. Однак на практиці виконання вищезазначених вимог ускладнюється можливістю повного або часткового руйнування матеріалу упаковки, надтекучістю рідкого азоту, який проникає і в мікротріщини; людським фактором. При доставці переліченого діагностичного матеріалу в поліетиленових пакетах для підтвердження діагнозу за «золотим стандартом» (вірусологічний метод) жодного разу не вдалося виділити ВХМ на культури клітин за причини мікробної контамінації діагностичного матеріалу, навіть у випадках використання подвійних доз антибіотиків. Тому в якості первинної упаковки для діагностичного матеріалу в подальшому використовували стерильні скляні пробірки багаторазового використання та одноразові поліпропіленові кріопробірки із кришками, що загвинчуються, та силіконовими прокладками.

Розроблена біологічно безпечна та економічно вигідна технологія упакування, доставки та наступного збереження в умовах кріобанку вірусного матеріалу включає використання базового принципу потрібної упаковки інфекційного діагностичного матеріалу. При цьому первинна герметична упаковка в оптимальній кількості до трьох первинних контейнерів, що поміщені в поліетилен у вертикальному положенні, занурюється в сорбент на основі природного алюмосилікату вермикуліту – «Сорбовер» (ТУ У 46.15.411-99). Кількість сорбенту повинна бути достатньою для поглинання інфекційного агента. Сорбент у свою чергу також поміщений в поліетиленовий мішечок, який занурюється у посудину Д'юара з рідким азотом (Рис. 1).

UA 82479 U



Комп'ютерна верстка М. Мацєло
 Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна
 ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

2

Рис. 1. Схема потрійного упакування вірусного матеріалу: 1 – зовнішній поліетиленовий пакет з фіксуючою стрічкою; 2 – фіксуюча стрічка поліетиленового пакету; 3 – поліетиленовий пакет з адсорбентом; 4 – фіксуюча стрічка поліетиленового пакету з адсорбентом; 5 – поліетиленовий пакет з криоконтейнерами; 6 – фіксуюча стрічка поліетиленового пакету з криоконтейнерами; 7 – сорбент; 8 – криоконтейнери.

Розробка біологічно безпечної технології доставки та наступного збереження в умовах кріобанку вірусного матеріалу обумовлена фізичними властивостями рідкого азоту, по-перше його кипінням навіть у посудині Дюара, що веде до перемішування всіх шарів рідини. Тому у випадку порушення хоча б однієї упаковки з вірусним матеріалом відбувається контамінація всіх поверхонь посудини. Таким чином основним пунктом, що визначає рівень біологічної безпеки кріоконсервування є надійність герметизації вірусного матеріалу всередині кріоупаковки.

Для цього ми розробили метод багатошарової герметизації вірусного матеріалу при його доставці та зберіганні у рідкому азоті. Транспортування та доставка посудин Д'юара з вірусомісним матеріалом у рідкому азоті здійснювалася з дотриманням заходів безпеки експлуатації ємностей з рідким азотом по обмеженню швидкості пересування по дорогах з різним покриттям, фіксації у вертикальному положенні та захистом від механічних пошкоджень.

Розробка біобезпечних технологій кріоконсервування, збереження та відтаювання вірусних патогенів проведена на моделі вірусу хвороби Марєка. Усього досліджено та паспортизовано 12 одиниць вірусних патогенів ВХМ. Біобезпечні технології кріоконсервування включають біобезпечну упаковку вірусів, які

кріоконсервуються за допомогою апарата програмного заморожування з наступним збереженням в умовах рідкого азоту та відтаювання за необхідності використання вірусних штамів.

Можливе використання декількох режимів (повільний або швидкий із застосуванням дезінфікуючих засобів в якості теплоносіїв). Застосування швидкої (зі швидкістю 300–400° за хвилину) програми кріоконсервування з використанням підтримуючого середовища й підтримуючого середовища з додаванням 10 % діметилсульфоксиду не забезпечують схоронності інфікованих клітин вище 30 %. Максимальна схоронність інфікованих клітин після кріоконсервування із застосуванням швидкої програми й середовища консервування, що включає живильне середовище 199 й середовище з додаванням 10 % інактивованої сироватки крові (ВРХ) і 10 % діметилсульфоксиду, становило 33,7 %. Застосування діметилсульфоксиду в концентрації 15 % у складі того ж кріозахисного середовища викликало тенденцію зниження інфекційної активності вірусу.

Застосування двоетапного режиму заморожування й середовища консервування, що включає живильне середовище 193 з додаванням 10 % інактивованої сироватки крові (ВРХ) і 10 % діметилсульфоксиду, дозволяє одержати належну схоронність інфікованих клітин, що забезпечує інфекційну активність штамів (Таблиця), які можуть використовуватися, як компоненти полівалентних гетерологічних атенуйованих вакцин проти ХМ.

Таблиця – Інфекційна активність виробничих штамів та атенуйованих ізолятів ВХМ і збереженість інфікованих клітин ФЕК, що були кріоконсервовані за двоетапного режиму заморожування

Назва штаму або ізоляту ВХМ	Збереженість клітин після розморожування, %	Титр інфекційної активності ВХМ до заморожування (ФОЕ/см ³)	Титр інфекційної активності ВХМ після розморожування (ФОЕ/см ³)
SBG	47,2±1,25	6,0×10 ⁶	10660±1,25
FC-126	78,4±1,47	5,3×10 ⁶	9330±1,25
ізолят 3/11	47,1±1,40	1,2×10 ⁴	12000±1,25
ізолят 4/11	51,4±1,40	1,07×10 ⁵	11660±1,25
ізолят 5/11	46,1±1,47	1,0×10 ⁴	10000±1,25

Примітка: рівень значимості $p < 0,005$

Дослідження з розробки біобезпечних умов і режимів відтаювання патогенного матеріалу показали, що найбільш безпечним є повільний безконтактний спосіб відтаювання у спеціальному боксі рівня BSL-2. При контактному способі відтаювання за швидким режимом є використання в якості теплоносіїв дезінфікуючих розчинів. Для попередження вибухів з утворенням аерозолу у випадках відтаювання пошкоджених ємностей з кріоконсервованим патогенним матеріалом при влученні в них рідкого азоту найбільш оптимальним дезінфікуючим засобом виявився 6 % перекис водню. При цьому зберегалися типова ультраструктура та морфологія віріонів ВХМ (Рис. 2).

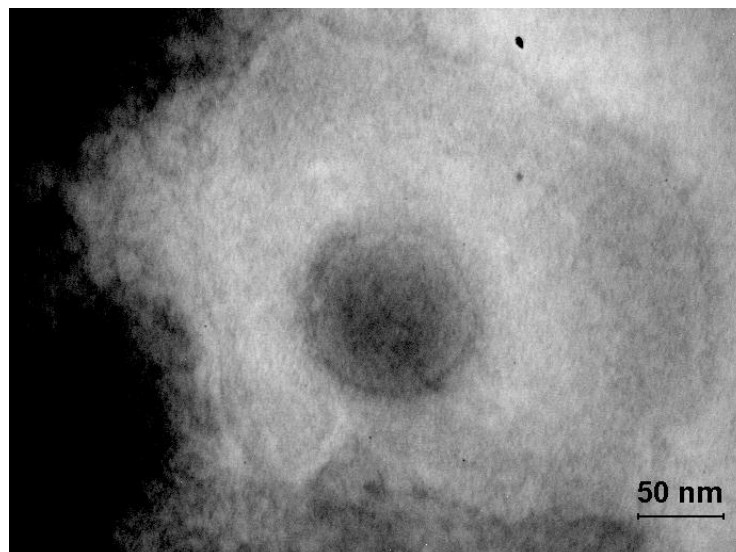


Рис. 2. Збереженість ультраструктури атенуйованого ізоляту 4/11, кріоконсервованого за двоетапної програми.

Визначення впливу терміну зберігання на інфекційні властивості досліджуваних штамів та ізолятів показало, що атенуйовані ареверсибельні ізоляти ВХМ першого серотипу 4/1 і 5/11 зберігали титри інфекційної активності впродовж 24 та 10 місяців спостереження відповідно за умов збереження у рідкому азоті (мінус 196 °С) на вихідному рівні.

Висновки. Таким чином, розроблені біобезпечні технології кріоконсервування та збереження вірусів і вірусовмісного матеріалу в умовах кріобанку складаються з розробки біологічно безпечної упаковки вилученого вірусовмісного біологічного діагностичного матеріалу, біологічно безпечної технології доставки та наступного збереження в умовах кріобанку вірусного матеріалу та біобезпечних технологій кріоконсервування, збереження та відтаювання вірусних патогенів.

Розроблена біологічно безпечна та економічно вигідна технологія упакування, доставки та наступного збереження в умовах кріобанку вірусного матеріалу включає використання базового принципу потрібної упаковки інфекційного діагностичного матеріалу, що являє собою економічну багатшарову упаковку кріоконтейнерів у поліетилен з наступним зануренням в адсорбуючий матеріал і знов у поліетилен. В якості сорбенту використано препарат на основі природного алюмосилікату вермикуліту – «Сорбовер». Метод багатшарової герметизації вірусного матеріалу при його доставці та зберіганні у рідкому азоті захищений деклараційним патентом України на корисну модель [4].

Дослідження з розробки біобезпечних умов і режимів кріоконсервування та відтаювання вірусного матеріалу (на прикладі ВХМ) показали, що найбільш оптимальним є застосування двоетапного режиму заморожування й середовища консервування, що включає живильне середовище 199 з додаванням 10 % інактивованої сироватки крові (ВРХ) і 10 % дімексиду. Це дозволяє одержати належну схоронність інфікованих клітин, що забезпечує збереженість ультраструктури та інфекційної активності вірусів і контактного способу відтаювання за швидким режимом (за температури 37 °С) з використанням в якості теплоносіїв дезінфікуючих розчинів.

Список літератури

1. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) [Текст]: монографія / Л.П. Дьяконов, Г.Т.Акиншина, В.С.Белоконь и др.; Під загальною редакцією Л.П.Дьяконова; - М.: «Спутник+», 2009. – 656 с.
2. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях [Текст] /Третье изд. ВОЗ, Женева, - 2004.- С.1-104.
3. Сергеев В.А. Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии [Текст] / В.А. Сергеев, Ю.А. Собко. – К.: Урожай, 1993. – 151 с.
4. Стегній М. Ю. Стегній Б. Т. «Спосіб біобезпечного упакування, збереження, доставки вірусів та вірусовміщуючого матеріалу в умовах кріобанку» [Текст]/ Стегній М. Ю. Стегній Б. Т. патент на корисну модель №82479. Бюл.№1512.08.2013.
5. Фрешни Р. Культура животных клеток: методы [Текст] / Р. Фрешни. – М.: Мир, 1989. – 332 с.
6. Biosafety, Biosecurity and prevention of Disease [el.source]/2006. – title from the screen [http://www.oie.int/eng/edito/en_edito_june03.htm].
7. Building Global Biosafety and Biosecurity: The Importance of Staying Ahead of the Research Curve/James M Welch. 14th Annual Conference of the European Biosafety Association. - 13-15April 2011. – Estoril/Portugal. –P.67.

BIOSAFE TECHNOLOGIES OF CRYOCONSERVATION AND PRESERVATION OF VIRUSES AND VIRUSCONTAINING MATERIAL IN THE CONDITIONS OF NSC «IECVM CRYOBANK

Stegny M.Yu.

National scientific center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkov

In article development stages of modern biosafe technologies of cryoconservation and preservation of viruses and viruscontaining material in the conditions of cryobank which include development of biologically safe packing of the allocated viruscontaining biological diagnostic material, biologically safe technology of delivery and the subsequent preservation in the conditions of cryobank of a virus material and biosafe technologies of cryoconservation, preservation of viruses and thawing of virus pathogens are opened. Researches on development of biosafe conditions and cryoconservation and thawing modes on the example of Marek's disease virus showed, the most optimum is application of a two-stage mode of freezing and the environment of the conservation including 199 nutrient medium with addition of 10 % of inactivated cattle's serum of blood from 10 % dimexid, allows to receive the necessary safety of the infected cages providing preservation of ultrastructure and infectious activity of viruses at a contact way of thawing applying a fast mode (at a temperature of 37 °C) with use disinfecting solutions.

Keywords: biosafe technologies, cryoconservation, preservation, Marek's disease virus, viruses.