



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **93501** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
C12N 1/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 02298	(72) Винахідник(и): Стегній Борис Тимофійович (UA), Стегній Марина Юріївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 06.03.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.10.2014	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.10.2014, Бюл.№ 19	

(54) СПОСІБ КОНТРОЛЮ ВІРУСНИХ ПАТОГЕНІВ КРІОБАНКУ

(57) Реферат:

Спосіб контролю вірусних патогенів кріобанку включає облік та моніторинг вірусних патогенів. Додатково використовують розроблені ННЦ "ІЕКВМ" біобезпечні технології кріоконсервування, збереження вірусів та вірусовмісного матеріалу в умовах кріобанку, проводять паспортизацію усіх патогенів вірусного походження.

UA 93501 U

Корисна модель належить до вірусології, біотехнології, а саме до способів контролю вірусних патогенів.

Розробка біологічно безпечних систем зберігання патогенного вірусного біоматеріалу за допомогою сучасних кріотехнологій необхідна для впровадження світових стандартів біобезпеки і біозахисту та запобігання поширенню збудників зоонозів та зооантропонозів. Сучасні вимоги належної лабораторної та виробничої практики (GLP, GMP) у наукових та діагностичних установах гуманної та ветеринарної медицини, які працюють з біологічними матеріалами, що представляють епідемічну чи епізоотичну небезпеку, тісно переплітаються з поняттями біобезпеки та біозахисту. Тому актуальним є розробка біологічно безпечних технологій кріоконсервування, збереження у рідкому азоті та відтаювання вилучених штамів з використанням біобезпечної упаковки вірусного біоматеріалу.

Існують способи контролю патогенних біологічних агентів ("Актуальные проблемы биобезопасности" Журнал Микробиологии Эпидемиологии и Иммунологии 2013 год). Як актуальна задача визначено застосування технологій щодо аналізу ризику при оцінці потенційно небезпечних біологічних об'єктів. Але при вирішенні цієї задачі наводяться тільки загальні положення теорії безпеки відносно питань забезпечення біобезпеки, та дані аналізу нормативно-методичної документації в області забезпечення біологічної безпеки при роботі з патогенними агентами на території тільки Російської Федерації.

Існує система контролю патогенів (Pathogen Assent Control System-Pacs Bulding a world of difference BLAK& VEATCH). Це електронна система для обліку та контролю колекцій біологічних агентів. СКП забезпечує безпечний, надійний і своєчасний метод обліку і моніторингу руху біологічних агентів. Це рішення є найближчим аналогом. Але за допомогою цієї системи проводиться лише інформаційне забезпечення, облік небезпечних патогенів та відстежується рух цих патогенів.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб контролю вірусних патогенів кріобанку, що включає облік та моніторинг вірусних патогенів, шляхом додаткового використання розроблених ННЦ "ІЕКВМ" біобезпечних технологій кріоконсервування, збереження вірусів та вірусовмісного матеріалу в умовах кріобанку, паспортизації патогенів вірусного походження кріобанку ННЦ "ІЕКВМ", щоб забезпечити ефективність способу.

Ефективність контролю базується на використанні у способі розроблених ННЦ "ІЕКВМ" біобезпечних технологій кріоконсервування, збереження вірусів та вірусовмісного матеріалу в умовах кріобанку, паспортизації патогенів вірусного походження кріобанку ННЦ "ІЕКВМ", що відповідає критерію "новизна". Спосіб виконується таким чином.

Дослідження проводять на моделі вірусу хвороби Марека, який належить до збудників другої групи патогенності. Матеріал для індикації ВХМ відбирають від птиці з клінічними ознаками ХМ, яку забивають для діагностики, або користуються патологічним матеріалом від щойно загиблої птиці.

Найбільш придатним матеріалом для вірусологічних досліджень є цільна гепаризована кров, яку відбирають у стерильні пробірки з яремної вени і поміщають в кріоконтейнери. Як кріоконтейнери випробовують 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. Після чого кріоконтейнери занурюють у рідкий азот. Відібраний патологічний матеріал доставляють для дослідження в посудині Дюара. Ефективність біобезпеки упаковки, що використовують при кріоконсервуванні, оцінюють згідно дотримання таких вимог щодо біобезпеки упаковки, а саме: зведення до мінімуму людського фактору при герметизації, надійності, зносостійкості та кратності використання. Вимоги, які висуваються до ємностей для кріоконсервування це: забезпечення належної герметичності протягом усіх маніпуляцій при кріоконсервуванні; біологічна інертність; висока теплопровідність. 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 у 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 в свою чергу також поміщений в поліетиленовий мішечок, який занурюється у посудину Дюара з рідким азотом. За необхідності використання вірусних штамів проводять їх відтаювання. Після чого проводять облік вірусних патогенів за допомогою електронної системи.

Приклад.

Розробка біобезпечних технологій кріоконсервування збереження та відтаювання вірусних патогенів була проведена на моделі вірусу хвороби Марека. 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. Можливо використовувати декілька режимів (повільний або швидкий з використанням дезінфікуючих засобів як теплоносіїв).

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 у суміші рівних обсягів середовища 199 і Ігла з додаванням 10 % сироватки крові великої рогатої худоби (в.р.х.). Зараження клітинного моношару проводили за стандартним методом. Культивування інфікованих вірусом клітин здійснювали у підтримуючому середовищі того ж складу, але з додаванням 2 % сироватки (в.р.х.). У роботі використовували виробничий штам SBG (Gallid herpesvirus type 2) вірусу другого серотипу, атенуйований штам NR8/08 першого серотипу, атенуйовані ізоляти 3/11-5/11 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. Для підвищення схоронності й життєздатності кріоконсервованих клітин застосовували кріопротектор діметилсульфоксид у кінцевих концентраціях від 2 до 10 %. Кріоконсервування інфікованих клітин здійснювали в кріопробірках фірми Nunk об'ємом - 4,5 см³ на програмному заморожуванні виробництва СКТБ і ОП ІПК і К НАН України. Інфекційну активність ВХМ визначали титруванням на первинній культурі клітин фібробластів ембріонів курей (ФЕК), в 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. Після цього інфіковану культуру інкубували за температури 39 °С 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 і 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 Т - титр інфекційної активності вірусу;

ХФ - кількість фокусів, підрахованих у кожному матраці із клітинами, зараженими певним розведенням вірусу; Р - розведення; N - кількість використаних для підрахунку ємностей.

Штам SBG і атенуйований штам NR8/08 першого серотипу, атенуйовані ізоляти 3/11; 5/11 ВХМ першого серотипу вірусу хвороби Марека активно розмножуються в 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-тріпсиноюю сумішшю з наступним додаванням кріозахисного середовища. Потім розфасовували в кріопробірки й кріоконсервували на програмному заморожувачі із застосуванням швидкої (зі швидкістю 300-400 °С за хв.) 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 середовища кріоконсервування використовувалися: підтримуюче середовище; підтримуюче середовище з додаванням 10 % діметилсульфоксиду; 199 живильне середовище з додаванням 10 % інактивованої сироватки крові (в.р.х.) і 10 % діметилсульфоксиду. Ефективність застосовуваних режимів кріоконсервування кріозахисних середовищ оцінювали по схоронності клітин і інфекційної 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.

Застосування швидкої (зі швидкістю 300-400 °С) за хвилину програми кріоконсервування з використанням підтримуючого середовища й підтримуючого середовища з додаванням 10 % діметилсульфоксиду не забезпечували схоронності інфікованих клітин вище 30 %. Максимальна схоронність інфікованих клітин після кріоконсервування із застосуванням швидкої програми й середовища консервування, що включає живильне середовище 199 та середовище з додаванням 10 % інактивованої сироватки крові (в.р.х.) і 10 % діметилсульфоксиду, становить 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 199 живильне середовище з додаванням 10 % інактивованої сироватки крові (в.р.х.) і 10 % діметиліду, дозволяє одержати належну схоронність інфікованих клітин, що забезпечує інфекційну активність штамів, які можуть використовуватися, як компоненти полівалентних гетерологічних атенуованих вакцин проти ХМ.

Визначення впливу терміну зберігання на морфологію та інфекційні властивості досліджуваних штамів та ізолятів показало, що виробничий штам SBG зберігав титри інфекційної активності впродовж тридцяти шістьох місяців спостереження за умов збереження у рідкому азоті (мінус 196 °С). При цьому зберігалися типова ультраструктура і морфологія віріонів ВХМ.

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 як теплоносіїв дезінфікуючих розчинів. Для попередження вибухів з утворенням аерозолів у випадках відтаювання пошкоджених ємкостей з кріоконсервованим патогенним матеріалом при влученні в них рідкого азоту, найбільш підходящим дезінфікуючим засобом для цього виявився 6 % перекис водню.

Таким чином розробка біологічно безпечних систем зберігання патогенного вірусного біоматеріалу за допомогою сучасних кріотехнологій необхідна для впровадження світових стандартів біобезпеки і біозахисту та запобігання поширенню збудників зоонозів та зооантропонозів в Україні.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб контролю вірусних патогенів кріобанку, що включає облік та моніторинг вірусних патогенів, який **відрізняється** тим, що додатково використовують розроблені ННЦ "ІЕКВМ" біобезпечні технології кріоконсервування, збереження вірусів та вірусомісного матеріалу в умовах кріобанку, проводять паспортизацію усіх патогенів вірусного походження.

Комп'ютерна верстка С. Чулій

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