

УДК 636.09:001.53:57.083.2

ГАВРАСЬЄВА Н.В., канд. вет. наук, gari-nata@ukr.net,

КУЗЬМИЧ Г.С., 80505752885@mail.ru,

*Державний науково-контрольний інститут біотехнології та штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ)*

## ВИМОГИ ВІТЧИЗНЯНИХ ТА ЕС НОРМАТИВНИХ ДОКУМЕНТІВ ДО РОБОТИ З ПЕРЕЩЕПЛЮВАНОЮ КУЛЬТУРОЮ КЛІТИН ПРИ ПРОВЕДЕННІ ПРОЦЕДУРИ ДЕПОНУВАННЯ

*Проведено аналіз нормативних документів ЕС та вітчизняних, які регламентують вимоги до перещеплюваних культур клітин які використовуються у ветеринарній медицині. Згідно рекомендацій Європейської фармакопеї, ДСТУ та МЕБ було проведено дослідження та процедуру депонування 3 сублінії перещеплюваних клітин РК-15, Vero, А-72 в ДНКІБШМ.*

**Ключові слова:** нормативні документи, культура клітин, депонування.

**Вступ.** Застосування культур клітин є найпоширенішим індикаційним методом у вірусологічній практиці та методом накопичення біомаси вірусів, хламідій й інших внутрішньоклітинних агентів у біотехнологічній промисловості. Широке використання культур клітин потребує постійного контролю їх біологічних властивостей, таких як міжвидова автентичність, каріотипічна стабільність та чистота від контамінуючих агентів. Останні роки в світі все більш активного розвитку ринку лікарських препаратів в гуманній та ветеринарній медицині гостро встає питання їх безпеки та довготривалого впливу на генетичний апарат тварин та людини. Загроза довготривалих змін в організмі тваринного світу встає небезпечніше в зв'язку ще з тим фактом, що законодавство багатьох країн не гармонізувало свої вимоги щодо виготовлення та безпеки лікарських препаратів.

**Метою роботи** було провести аналіз вимог національних стандартів, рекомендацій Міжнародного епізоотичного бюро та Європейської фармакопеї до роботи з перещеплюваними культурами клітин.

**Матеріали і методи:** Нормативно-правові документи ЕС та вітчизняні, які регламентують вимоги до перещеплюваних культур клітин які використовуються у ветеринарній медицині [1-5].

**Результати:** Було проведено процедуру депонування в ДНКІБШМ 3 сублінії перещеплюваних клітин (РК-15 - перещеплювані клітини нирки свині, Vero - перещеплювані клітини нирки африканської зеленої мавпи, А-72- клітини нирки собаки) за показниками, які рекомендовані нормативними документами. Культури вирощували з використанням поживних середовищ Ігла DMEM, до яких додавали 10 % ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби (ВРХ) при 37<sup>0</sup>С; рН 7,2-7,4, виробництва GIBCO та SIGMA.

*Мікроскопію* проводили сформованого моношару культури клітин згідно Настанови щодо стандартів для діагностичних тестів і вакцин/Міжнародне Епізоотичне Бюро (МЕБ) та рекомендацій Європейської фармакопеї 5.2.4.. Не було відмічено контактних інгібіторів, багатоядерних клітин і будь-яких інших клітинних аномалій, та зміни кольору поживного середовища;

*Відсутність контамінації бактеріальної та грибової мікрофлори* згідно ДСТУ4483:2005 та та та рекомендації Європейської фармакопеї 2.6.1. Культури клітин висівали у пробірки з поживним середовищами МПА та ТГС при визначенні бактеріального забруднення. А при дослідженні на грибову контамінацію – в пробірки з середовищем

Сабуро. Для цього із загальної середньої проби висівають по 1 см<sup>3</sup> в три пробірки з ТГС. Дві з яких інкубували у термостаті протягом 14 діб за температури 21±1°C, а третю витримували також 14 діб за температури 37±0,5°C. Робили висіви по 0,5 см<sup>3</sup> на МПА та Сабуро, інкубували впродовж 14 діб за температури 37±0,5°C і 21±1°C відповідно. Досліджувані проби виявились не контаміновані бактеріальною та грибовою мікрофлорою.

*Відсутність контамінації мікоплазмами.* Контроль відсутності контамінації мікоплазмами проводяться згідно ДСТУ 4613:2006 та та рекомендації Європейської фармакопе 2.6.7. Культивували висіви за температури (37±1)°C 21 день, огляд висівів проводять кожного дня. Використовували не менше, ніж по два види рідких та твердих живильних середовищ для культивування мікоплазм ( глюко-зоферментуючих та аргінінферментуючих). 4 чашки Петрі для кожного пересіву. Засівали кожен з чотирьох чашок з твердим середовищем по 0.25 см<sup>3</sup> тестового зразку, а також вносили 10 мл проби в 100 см<sup>3</sup> рідкого середовища. Половину чашок культивували за температури (35 - 37)°C в аеробних умовах в атмосферному повітрі з відповідною вологістю та вмістом CO<sub>2</sub> – від 5% до 10%, та другу половину чашок – в анаеробних умовах в атмосфері азоту з відповідною вологістю та вмістом CO<sub>2</sub> – від 5% до 10% впродовж 21 доби. На 3-тю чи 4-ту добу після інокуляції по 0.25 см<sup>3</sup> культуральної рідини переносили на тверді середовища ( одну чашку культивують за температури 35 - 37°C в аеробних умовах в атмосферному повітрі з відповідною вологістю та вмістом CO<sub>2</sub> – від 5% до 10%, та другу в анаеробних умовах в атмосфері азоту з відповідною вологістю та вмістом CO<sub>2</sub> – від 5% до 10%) до 21-го дня тестування. Висіви із рідкого середовища проводили на 6-у, 7-у, 8-у, 13-у та 14-у добу.

У кінці інкубаційного періоду (21-а доба) ретельно перевіряли всі висіви на твердих середовищах на присутність мікоплазм. У досліджуваних зразках ріст колоній мікоплазм не спостерігали.

При дослідженні на *відсутність контамінації сторонніх вірусів* в Україні використовують ДСТУ 4517:2006. Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи виявлення контамінації сторонніми вірусами та рекомендації Європейської фармакопеї- 5.2.4. Досліджувані культури клітин інкубували протягом трьох пересівів з інтервалом (5—7) діб. По закінченні періоду культивування перещеплювані клітинні культури досліджували під мікроскопом на наявність цитопатичних змін (збільшення 70<sup>x</sup>). Фарбували кожний досліджуваний моношар відповідною цитологічною фарбою. Досліджували всю площу кожного фарбованого моношару на наявність тілець включень, збільшену кількість гігантських клітин чи іншу цитопатологічну ознаку дегенерації клітин, яка може бути викликана стороннім збудником.

Таблиця 1

**Перелік сторонніх вірусів - найвірогідніших контамінантів культур клітин**

Культури клітин	Перелік сторонніх вірусів
Культури клітин ВРХ, кіз та овець	аденовірусів ВРХ, парвовірусу ВРХ та респіраторного синцитіального вірусу ВРХ, вірусу хвороби Ауескі
Культури клітин собак	коронавірусу собак; вірусу чуми м'ясоїдних та парвовірусу собак
Культури клітин коней	герпесвірус та вірус артеріїту коней
Культури клітин кішок	вірусу інфекційного перитоніту кішок та вірус панлейкопенії кішок
Культури клітин свиней	аденовірус та парвовірус свиней, вірус трансмісивного гастроентериту, а також гемаглютинувального вірусу енцефаліту свиней
Усі культури клітин	вірус діареї ВРХ, реовірус та вірус сказу

Протягом терміну культивування в моношарі клітин не з'являлося ознак дегенерації, що викликані інфекційним агентом.

При виявленні гемадсорбуючих вірусів моношари загальною площею не менше 70 см<sup>2</sup> кілька разів промивали буферним розчином і додавали суспензію еритроцитів (0,25-відсоткову завись еритроцитів морської свинки та курчати в 0,85-відсотковому розчині натрію хлориду в об'ємі, що достатній для того, щоб покрити увесь моношар клітин) для рівномірного покриття площі моношару. Після різного інкубаційного періоду клітини досліджували на наявність гемадсорбції. Цитопатичні зміни та гемадсорція були відсутні.

*Karjotum* випробування описані в рекомендаціях Європейської фармакопеї- розділ 5.2.4. Проводили дослідження хромосом не менше ніж у 50 клітинах на стадії мітозу, отриманих з головних посівних клітин на рівні другого пасажу. При описанні хромосом звертали увагу на їх число, розмір сегментів, місце знаходження перетяжок, структурного гетерохроматину. З метою диференціації цих ознак застосовували G-, C-, і Ag- фарбування препаратів хромосом. З метою вивчення мітотичної активності і патологічних мітозів культури клітин вирощували на накривних скельцях. Клітини після фіксації в спирт-оцтовому розчині фарбували гематоксиліном Карачі. Мітотичну активність визначали як відношення числа клітин, що знаходились у фазі ділення, до загальної кількості врахованих клітин з розрахунку на 1000 клітин. Показник мітотичної активності клітин виражали в проміле (‰). Одночасно з'ясовували кількість патологічних мітозів, а також окремих форм патологічних мітозів по відношенню до їх загальної кількості, які приймали за 100 %. Каріотипи був ідентичним на 15 пасажі.

Культури клітин РК-15, Vero, A-72 відповідали за заявленими показниками нормативних документів ДСТУ та Європейської фармакопеї

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** Згідно рекомендацій нормативних документів ДСТУ та Європейської фармакопеї були дослідженні перещеплюванні культури клітин були. Отримані результати досліджень були внесенні до паспорту на культуру клітин (РК-15, Vero, A-72) та проведено депонування даних ліній. Планується провести дослідження інших перещеплюваних культур клітин які є в колекції ДНКІБШМ та провести процедуру депонування.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines / Office International desepisootic (OIE), Ch. 1.1.4 Tests for sterility and freedom from contamination of biological materials // 2000.- P. 24- 31 (Настанови щодо стандартів для діагностичних тестів і вакцин / Міжнародне Епізоотичне Бюро (МЕБ), Ч. 1.1.4 Тест на стерильність та відсутність контамінації біологічних матеріалів).
2. Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи визначення бактеріальної і грибною контамінації : ДСТУ 4483:2005 / [Н. Пархоменко та ін.]. – Увед. вперше ; чинний від 2005–11–25. – Київ : Держспоживстандарт України, 2006. – III, 20 с., включ. обкл. – (Нац. стандарт України).
3. Препарати біологічні для ветеринарної медицини. Метод визначення контамінації мікоплазмами: ДСТУ 4613:2006 / [Л. Акименко та ін.]. – Увед. вперше ; чинний від 2006–06–29. – Київ : Держспоживстандарт України, 2006. – III, 11 с., включ. обкл. – (Нац. стандарт України).
4. Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи виявлення контамінації сторонніми вірусами: ДСТУ 4517:2006 / [О. Блоцька та ін.]. – Увед. вперше ; чинний від 2007-10-01. – Київ : Держспоживстандарт України, 2006. – III, 13 с., включ. обкл. – (Нац. стандарт України).
5. Cell cultures for the production of veterinary vaccines 5.2.4. // European Pharmacopoeia 8.0

**ТРЕБОВАНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ И ЕС НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ К РАБОТЕ ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРОЙ КЛЕТОК ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПРОЦЕДУРЫ ДЕПОНИРОВАНИЯ** / Гаврасьева Н.В., Кузьмич Г.С.

*Изучены нормативные документы ГСТУ, МЭБ и Европейской фармакопеи при работе с культурой клеток. Следуя рекомендациям нормативных документов было проведено депонирование культур клеток РК-15, Vero, A-72 в ГНКИБШМ. Культура клеток была исследована за такими показателями: микроскопия, контаминация бактериальной и грибной микрофлорой, контаминация микоплазмами, контаминация вирусами, кариотип. Результаты исследований были внесены в паспорт культур клеток.*

**Ключевые слова:** нормативные документы, культура клеток, депонирование.

**REQUIREMENTS OF UKRAINE AND EU NORMATIVE DOCUMENTS TO THE WORK OF CELL CULTURES IN THE DEPOSIT PROCEDURE** / Gavrasieva N.V., Kuzmych G.S.

**Introduction.** *The widespread use of cell cultures requires constant monitoring of their biological properties, such as interspecies authenticity, karyotypic stability and purity of contaminating agents.*

**The goal of the work** *was to analyze the requirements of SSU, OIE and European Pharmacopoeia to work with cell cultures.*

**Materials and methods:** *Normative documents of the EU, OIE and SSU, which regulate requirements for cultures of cells used in veterinary medicine.*

**Results:** *It was deposited in 3 cultures of cells (PK-15, Vero, A-72) in the indicators recommended by normative documents at the SSCIBMS. The cultures were grown using DMEM Eagle nutritional media, to which 10% of the embryonic serum of bovine blood (BRL) was added at 37°C; pH 7.2-7.4, manufactured by GIBCO and SIGMA.*

**The microscopy** *was carried out by the formed cell culture monolayer according OIE and the recommendations of the European Pharmacopoeia 5.2.4.. There was no marked contact inhibitors, multicellular cells and any other cellular anomalies, and changes in the color of the nutrient medium;*

**The absence of contamination of bacterial and fungal microflora** *according to SSU 4483: 2005 and those and recommendations of the European Pharmacopoeia 2.6.1. The investigated samples were not contaminated with bacterial and fungal microflora.*

**The absence of mycoplasma contamination.** *Monitoring of the absence of contamination with mycoplasmas is carried out according to SSU 4613: 2006 and the recommendations of the European Pharmacopoeia 2.6.7. In the studied samples, the growth of colonies mycoplasma was not observed.*

**In the study of the absence of contamination of foreign viruses in Ukraine,** *SSU 4517: 2006 is used. Veterinary preparations immuno-biological. Methods of detecting contamination by foreign viruses and recommendations of the European Pharmacopoeia - 5.2.4. During the term of cultivation in the cell monolayer, there were no signs of degeneration caused by an infectious agent.*

**The karyotype** *of the test is described in the recommendations of the European Pharmacopoeia - section 5.2.4. The karyotypes were identical on 15 passages. Cultures of cells RK-15, Vero, A-72 corresponded to the declared indicators of normative documents SSU and European Pharmacopoeia.*

**Conclusions and perspectives of further research.** *According to the recommendations of normative documents of SSU, OIE and European Pharmacopoeia were investigated cell culture. The obtained research results were entered into the culture passport (RK-15, Vero, A-72) and deposited data lines. It is planned to carry out research on other cultures of cells that are in the collection at the SSCIBMS and to conduct a deposit procedure.*

**Key words:** *normative documents, cell culture, deposit.*

## REFERENCES

1. Ch. 1.1.4 Tests for sterility and freedom from contamination of biological materials (2000). *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. P. 24-31 [in English]
2. Preparaty veterynarni imunobiologichni. Metody vyznachennja bakterial'noi' i grybnoi' kontaminacii' [Veterinary immunobiological preparations. Methods of determination of bacterial and fungal contamination] (2006): *DSTU 4483: 2005 from 25<sup>th</sup> November 2005*. Kiyev: Gospotrebstandart Ukrainy [in Ukrainian].
3. Preparaty biologichni dlja veterynarnoi' medycyny. Metod vyznachennja kontaminacii' mikoplazmamy [Biological preparations for veterinary medicine. Method of determining the contamination of mycoplasmas ] (2006) *DSTU 4613: 2006 from 29 juni 2006*. Kiyev: Gospotrebstandart Ukrainy [in Ukrainian].
4. Preparaty veterynarni imunobiologichni. Metody vyjavlennja kontaminacii' storonnimy virusamy [Veterinary immunobiological preparations. Methods of detecting contamination by third-party viruses] (2006) *DSTU 4517: 2006 from 1<sup>th</sup> Oktober 2007*. Kiyev: Gospotrebstandart Ukrainy [in Ukrainian].
5. Cell cultures for the production of veterinary vaccines 5.2.4. // *European Pharmacopoeia 8.0* [in English]