

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Согласовано
Начальник отдела науки и
внедрения
Н.И. Доста
28 ноября 1997

Утверждаю
Заместитель министра
В.П. Филонов
18 декабря 1997

№63-9709

Методические рекомендации

**Подготовка микроорганизмов к регистрации и депонированию в
национальную коллекцию**

Минск-1997

Основное учреждение-разработчик:
Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии

Составители документа:

Рустамова Л.М., канд.мед.наук, старший научный сотрудник отдела диагностики и профилактики вирусных инфекций БелНИИЭМ; Ермакова Т.е., канд. биол.наук, старший научный сотрудник отдела диагностики и профилактики вирусных инфекций БелНИИЭМ; Марьянкова Р.Ф., канд.биол.наук, старший научный сотрудник отдела диагностики и профилактики вирусных инфекций БелНИИЭМ; Еремин В.Ф., канд.биол.наук, старший научный сотрудник отдела ингибиторов вирусной активности БелНИИЭМ; Петкевич А.С., канд.мед.наук, зам.директора по науке БелНИИЭМ; Титов Л.П., доктор мед.наук, профессор, директор БелНИИЭМ.

Рецензент:

заведующий кафедрой микробиологии БелГИУВ, доктор мед.наук Кукулянский А.А.

Ответственный за издание:

заместитель директора БелНИИЭМ по научной работе, канд.мед.наук Петкевич А.С.

В рекомендациях даны основные положения и принципы подготовки вирусных и бактериальных агентов, патогенных для человека, для регистрации в Национальную коллекцию Республики Беларусь.

Методические рекомендации предназначены для вирусологических и микробиологических лабораторий научно-исследовательских и академических институтов, санитарно-эпидемиологических и лечебных учреждений здравоохранения.

1. Введение.

Коллекционирование биологических материалов с целью их длительного хранения, последующего использования известно давно. По-видимому, первые коллекции микроорганизмов с описанием их характерных свойств, взятых в качестве эталонных, разрабатывались и сохранялись в лабораториях, где проводилось их изучение.

В начале XX века, с появлением большого количества культур микроорганизмов, представлявших значительный интерес для науки и практики, возникала необходимость в учреждениях - микробных коллекциях, которые взята на себя заботу о поддержании и сохранении культур. Значение этих коллекций велико, ибо поддерживаемые и сохраняемые культуры представляют большую настоящую и потенциальную ценность для человечества.

Современные коллекции, благодаря успехам науки и техники, из хранилищ микроорганизмов превратились в многофункциональные организации:

центры по идентификации, консервации микроорганизмов, принятию патентуемых штаммов для депонирования; центры основных микробных ресурсов для биотехнологий.

При активном участии специалистов по коллекциям микроорганизмов в последние годы успешно разрабатывается и решаются выдвигаемые жизнью экологические проблемы. Это и получение генетически измененных микроорганизмов и сохранение микробного разнообразия в осложняющейся экологической обстановке.

Национальная коллекция вирусов и бактерий, создана на базе Белорусского НИИ эпидемиологии и микробиологии в 1995 г. Она сформировалась из коллекции при учреждении и представляет собой государственный фонд отечественных и зарубежных штаммов вирусов и бактерий, патогенных для человека.

Главной задачей коллекции является коллекционирование и сохранение в активном состоянии и с характерными свойствами типовых штаммов вирусов и бактерий, описанных в нашей республике и за ее пределами с учетом их потенциальной ценности для развития теоретических основ медицинских и биологических наук, для изучения этиологии, эпидемиологии заболеваний человека, разработки диагностических и профилактических препаратов; депонирование оригинальных авторских штаммов вирусов и бактерий, выделенных на территории Республики Беларусь, референс-штаммов, рекомбинантов и мутантов, селекционированных экспериментально, штаммов продуцентов диагностических, вакцинных и лечебных препаратов.

Процедура депонирования проводится в соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры подписанным 28 апреля 1977 года. Инструкции к нему.

В своей работе Национальная коллекция вирусов и бактерий руководствуется правилами режима работы с микроорганизмами 1-11 групп.

2. Подготовка микроорганизмов к депонированию.

2.1. Культивирование вирусов I-IV групп

Исходным материалом для восстановления вирусов I-IV групп являются либо 10% суспензия инфицированной ткани мозга белых мышей в растворе Хенкса, осветленная центрифугированием при 3000 об/мин, в течение 10 мин, либо культуральная вирусодержащая жидкость. Это должен быть генетически однородный материал с точной историей пассажей.

Для культивирования вирусов используются перевиваемые клеточные линии почек африканских зеленых мартышек (Vero, Vero E-6), клетки карциномы шейки матки человека (Her-2), фибробластов эмбриона мыши L-41), выращенные в пластиковых матрацах (Sigma, USA). В качестве оддерживающей используется среда MEM (Sigina, USA), содержащая 10 мМ НЕРЕС, 0.075 % NaHCO₃, 2% эмбриональной телячьей сыворотки, прогретой при 56 °С в течение 30 мин. и 200 мкг/мл гентамицина.

Учитывая основные закономерности репродукции вирусов в клеточных линиях, для восстановления и накопления вирусного материала подбирается наиболее благоприятная линия клеток и низкая множественность инфицирования, порядка 0.1-0.01 БОЕ/клетку. Для вирусов I-II групп (арена- и филовирусы) среди всех клеточных систем выбраны линии Vero, Vero E-6, в которых происходит эффективное размножение и накопление вирусного материала. Для вирусов III (полиовирусы) и IV групп (вирус кори) линии L-41 и Herp-2 соответственно. Зараженные клеточные линии инкубируют при 7°C в течение 3-5 суток. В культуральной жидкости определяют инфекционную активность вируса методом бляшек под агаровым покрытием на монослое клеток Vero. При получении исходного вирусного материала для коллекции проводится 2-3 пассажа вирусов в перmissive клеточных линиях. При этом инфекционная активность достигает 5-7 lg БОЕ/мл, что является достаточным для последующей лиофилизации и длительного хранения. Наиболее оптимальными режимами хранения вирусосодержащего материала признано хранение при низких температурах (-20 С - -70 °С), в жидком азоте, лиофильно высушенными. Способы хранения подбираются индивидуально с учетом особенностей вирусного материала.

2.2. Технология культивирования ВИЧ - izmb

Для накопления вирусной массы используются суспензионные культуры клеток, перmissive к ВИЧ: MT-4; SEM-SS; C8166; Molt4/8; Jurkat tat3.

Подбор оптимальной клеточной культуры осуществляется путем заражения инфицированной вирусом суспензией клеток в рабочем разведении. Подходящей считается культура клеток, а которой стабильно на протяжении 3-4 недель определяются вирусные антигены. Контроль за накоплением вируса осуществляется комплексом методов: непрямой иммунофлюоресценции, ИФА на антигены ВИЧ (обычно p24), иммуноблотинга, визуально с помощью микроскопа по обнаружению цитопатического действия вируса, определения обратнo-транскриптазной активности, а также обнаружением зрелых вирусных частиц электронно-микроскопически. Лимфобластоидные культуры клеток, перmissive к ВИЧ, адаптированы для роста в среде RPMI 1640, которая содержит следующие ингредиенты:

на чистой 225 мл среды - 3% L-глутамин - 5 мл
40% глюкоза - 2.1 мл
200 Ед/мл инсулин - 0.25 мл
1M HEPES - 2.5 мл
ЭТС - 25-30 мл

При приготовлении питательной среды необходимо тщательно следить за концентрацией ингредиентов.

Заражение чистых культур клеток производится вирусосодержащей культуральной жидкостью с инфицированными клетками в соотношении 1:5 (по объему) или 1:20 - 1:30 (по количеству клеток). На третьи сутки после заражения добавляют свежую среду роста из соотношения 20-30% от объема культуральной среды во флаконе. На 6-7 сутки снимается весь урожай вируса и добавляются свежие клетки в выше указанной концентрации.

Инфекционный титр вируса определяется титрованием последнего десятикратным шагом на чувствительных культурах клеток и последующего подсчета 50 % тканевой цитопатической дозы визуально или с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции.

Культуру клеток с вирусом морозят 10% диметилсульфоксида (ДМСО) с 40-50 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) в концентрации 8-10 млн. кл./чл. Для замораживания готовится замораживающая смесь, состоящая из ДМСО: среда RPMI 1640:ЭТС в соотношении 1:4:5, соответственно. К клеткам за сутки перед замораживанием добавляется свежая среда роста. В день замораживания клетки сливаются в центрифужные стаканы и осажда-

ется низкоскоростным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин. После осаждения подсчитывается количество клеток, добавляется среда RPMI 1640 с 20 % ЭТС, чтобы получить нужную концентрацию и к ним по каплям в течение 2-х минут на ледяной бане добавляется замораживающая смесь в соотношении 1:1. Клетки быстро разливаются по ампулам и опускаются в пары азота на ночь. На следующий день клетки опускаются в жидкий азот.

2.3. Культивирование бактерий

В литературе имеется много данных о самых разнообразных способах хранения музейных культур: методы основанные на бактериостазе, например, лиофилизация, хранение при температурах – 20 °С, - 70 °С, или более старые способы, состоящие в поддержании полностью выросшей культуры на питательной среде при температурах выше 0 °С

Наиболее широко распространенным способом поддержания коллекций живых культур являются периодические пересевы на свежие питательные среды. Однако по мере увеличения объема коллекции это становится все более трудной задачей. Тем не менее, многие микроорганизмы в крупнейших коллекциях сохраняются таким путем.

При выборе питательной среды необходимо помнить, что жидкие среды не пригодны для сохранения культур, ибо при попадании в них быстрорастущих загрязняющих микроорганизмов последние могут "затопить" исходную культуру.

Обычно причиной гибели микроорганизмов, при их поддержании на плотных питательных средах, является их обезвоживание. Применение в качестве среды для поддержания культуры полужидкого питательного агара (т.е. 0.6 % вес/объем) и засев микроорганизмов "уколом" внутрь агара уменьшают риск обезвоживания. Преследуя ту же цель, покрывают растущие на скошенном агаре или столбиках агара культуры слоем жидкого стерильного минерального масла (вазелинового или парафинового) толщиной 2см.

Условия хранения культур (подходящая среда, сроки культивирования, температура хранения) должны быть выбраны индивидуально. Кроме того, при сохранении микроорганизмов в питательных средах некоторые свойства и признаки (морфологические, культуральные, физиологические, антигенные) подвергаются изменениям, что может обесценить коллекционные культуры.

Деление клеток можно остановить путем замораживания. Однако этот метод может привести к гибели большей части культуры. Кроме того, часть культуры может погибнуть при ее последующем восстановлении из замороженного состояния. Гибель клеток может быть следствием денатурации под влиянием концентрированных растворов солей или, возможно, структурной дезорганизации, вызываемой внутриклеточными или внеклеточными кристаллами льда.

Бактерии можно хранить в течение многих лет при низкой температуре в среде содержащей глицерин, в концентрации 15 % без существенного снижения жизнеспособности. Культура может храниться при - 20 °С и -70 °С. Замораживать следует по несколько флаконов каждой культуры объемом до 1 мл. В этом случае жизнеспособные бактерии можно извлекать из суспензии в течение многих лет после того как были разморожены.

Методом наиболее отвечающим цели сохранения исходных культур является лиофилизация или высушивание из замороженного состояния под вакуумом. Для успешной лиофилизации необходимо учитывать следующие факторы:

1. Выращивание культур должно проводиться в оптимальных условиях.
2. Культуры для лиофилизации берутся в конце логарифмической фазы роста .
3. Лучшими суспензионными средами считаются сахарозо-желатиновые среды. Mist. Dessicans и обезжиренное молоко.
4. Выбор густоты суспензии для лиофилизации зависит от природы лиофилизируемого микроорганизма.
5. Остаточная влажность лиофилизируемых культур должна быть в пределах 2 %

6. Методика вывода лиофилизируемых культур из состояния анабиоза существенно отражается на числе клеток, способных к размножению при высеве на питательные среды.

Поэтому, для работы с культурами микробов, высушенными из замороженного состояния под вакуумом необходимо соблюдать следующие правила:

1. Культура бактерий высушенная из замороженного состояния под вакуумом, может храниться неопределенно долгое время при сохранении вакуума в ампуле и соблюдении температуры не выше +10 °С

2. Для восстановления жизнеспособности культуры ампулу с высушенным штаммом вскрывают стерильно над подносом или лотком. Верхний конец ампулы нагревают на пламени горелки и снимают парафин, затем кусочком стерильной ваты, смоченным в стерильной воде, осторожно прикасаются к оттянутому концу ампулы так, чтобы получилась небольшая трещина, и той же мокрой ватой обводят вокруг носика ампулы. После образования круговой трещины, легким ударом пинцета удаляют конец ампулы.

3. После вскрытия ампулы в нее стерильно наливают 0.3 - 0.5 мл жидкой питательной среды.

4. После растворения сухого содержимого ампулы его переносят пастеровской пипеткой в пробирку с жидкой или плотной питательной средой и 18 - 24 h выращивают при температуре и условиях оптимальных для культивирования микроорганизмов данного вида.

5. В первых пересевах бактерии обладают несколько пониженной жизнеспособностью. Для восстановления полной жизнеспособности требуется 2-3 пассажа на питательных средах, соответствующих потребностям микроорганизмов данного вида. Рекомендуется пользоваться для работы культурой после 2-3 пересевов!

Для предупреждения гибели коллекционных культур рекомендуется:

1. Хранить их одновременно несколькими разными способами, и по возможности, не менее, чем в двух разных коллекциях.

2. Производить периодические пересевы сохраняемых культур в свежие питательные среды, обращая внимание при этом не только на факты общей выживаемости их, но и на кривые ее падения. Для каждого штамма необходимо вести Карту хранения штамма (прилагается). Последний прием контроля тем более важен, что подсчеты и изучение колоний, выросших после разных сроков хранения коллекционных культур, естественно приведут к более основательному изучению вопроса изменчивости их потомства.

3. Перечень документов, представляемых при регистрации и депонировании микроорганизмов.

3.1. Представление директоров или Ученых советов институтов с просьбой о депонировании штамма. В нем содержится описание способа выделения или источника получения штамма, основные характеристики, отличие от стандартного вируса (если таковые есть), биологические свойства, количество пассажей, титр, необходимость получения или выделения, область использования, авторы штамма.

Для депонирования принимается лиофильно высушенная и запаянная под вакуумом в ампулы содержащая микроорганизмы жидкость не более третьего пассажа (или другой субстрат, если это единственный способ сохранить материал) в количестве десяти ампул. Каждая ампула снабжена этикеткой, содержащей:

Название вируса, Штамм, Номер пассажа, Дата сушки
--

Название бактерии, Номер, присвоенный коллекцией, Дата сушки

К штамму вируса, прилагаются три ампулы специфической лиофильно высушенной сыворотки.

После оформления указанной документации и передачи штамма выдается "Удостоверение о депонировании штамма", в котором зафиксировано время депонирования, штамм, его основные характеристики, номер депонента коллекции, авторы штамма.

3.2. ПАСПОРТ ШТАММА ВИРУСА

Кодовый номер _____

Название вируса (штамма) _____

Место в универсальной системе _____

(семейство, токсонимическая

и антигенная группа)

Выделен: год _____ где _____

от кого и из какого материала _____

Кем выделен _____

(страна, институт, автор)

Физико-химические свойства: криптограмма _____

размер _____ фильтрация _____

РНК _____ ДНК _____

Генетические признаки _____

Прочие свойства _____

Антигенные свойства _____

Количество пассажей _____

Оптимальный титр _____

Режим высушивания _____

Дата сушки и закладки в музей _____

Условия хранения _____

Дата проверки штамма _____

Научный сотрудник _____

Патогенность для человека _____

Чувствительность к экспериментальной инфекции (животные, эмбрионы и клеточные культуры)

Экспери- ментальная мо- дель	Возраст	Заражение метод	мл.	Про- явление инфекции	Титр
------------------------------------	---------	--------------------	-----	-----------------------------	------

Где хранится вирус _____

(учреждение, лаборатория)

3.3. ПАСПОРТ ШТАММА БАКТЕРИЙ

Кодовый номер _____

Видовое название культуры (штамма) _____

Место в универсальной системе _____
(семейство, токсономическая
_____ и антигенная группа)

Выделен: год _____ где _____
от кого и из какого материала _____

Кем выделен _____
(страна, институт, автор)

Культурально-морфологические свойства:
Генетические признаки _____

Прочие свойства _____

Антигенные свойства _____

Способ, условия и состав среды для хранения штамма _____

Способ, условия и состав среды для размножения штамма _____

Режим высушивания _____

Дата сушки и закладки в музей _____

Дата проверки штамма _____

Научный сотрудник, ответственный за хранение штамма _____

Патогенность для человека _____

Где хранится штамм _____
(учреждение, лаборатория)

3.4. АКТ ПЕРЕДАЧИ ШТАММА

Акт передачи штампа в Национальную коллекцию

от "___" _____ 199 г. N

Мы, нижеподписавшиеся, _____
(должность, Ф.И.О. передающего штамм

наименование организации)

_____ (должность, Ф.И.О. получающего штамм)

Составили настоящий акт о том, что согласно распоряжению руководителя Национальной коллекции _____

_____ произведена передача штамма:

_____ (наименование вида, количество, упаковка)

Дата передачи _____

Передал: _____
Ф.И.О., подпись

Принял: _____
Ф.И.О., подпись

Литература:

1. "Инструкция о противозидемическом режиме работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями инфекционных заболеваний I-II групп / МЗ СССР. - Саратов, 1979.- 96 с.

2. Калапуцкий Л.В.// Микробиологии 1993. Т. 62. N2 С. 362-356.

3. Лобанок А.Г., Беликова В."//Коллекция культур микроорганизмов: перспективы: их развития в Республике Беларусь.- Весці Акадэміі навук Беларусі. N3. 1995. с. 113-117

4. Мейнелл Дж., Мейнелл Э.// Экспериментальная микробиология.-Мир, Москва, 1967.

5. Маниатис Т./Методы генетической инженерии.- Мир, Москва, 1984.

6. Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов,/ Наука,-Москва, 1967.

7. Неклюдова Л.И., Гуненник А.Е., Федорова Д.5. и др.//Пособие по практическим занятиям по вирусологии. Ч. 1 - Москва, 1980. -37 с.

8. "Положение о порядке учета, хранения, передачи и транспортировки микроорганизмов I-IV групп патогенности /СП 1.2 - 95, утвержденные Постановлением Госкомсанэпиднадзора России от 23.03.95, N14.

9. Фатеева М.В.// Успехи микробиологии. 1933. Т. 18. С. 193-215

10. Kirsop B.E., DaSilva E.J. //Living Resources for Biotechnology.

Yeasts/ Eds B.E. Kirsop and C. P. Kurtzman. N.Y., Cambridge, 1988. P.199-213