



Namnażanie wirusa choroby Derzsyego w hodowli fibroblastów zarodka gęsi (GEF) z zastosowaniem bioreaktora Celligen Plus

Wojciech Rzeski¹, Roman Paduch^{1*}, Wojciech Kozdrun²,
Józef Kaczor¹, Hanna Czekaj², Elżbieta Samorek-Salamonowicz²,
Martyna Kandefer-Szerszeń¹, Barbara Zdzińska¹,
Andrzej Dawidowicz³

¹Zakład Wirusologii i Immunologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej,
Lublin

²Państwowy Instytut Weterynaryjny, Puławy

³Zakład Fizyki Chemicznej, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej,
Lublin

*Stypendysta Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej w 2002 r.

Propagation of Derzsy disease virus in goose embryo fibroblasts. An application of the Celligen Plus bioreactor

Summary:

Derzsy disease is a fatal hepatitis of young geese under the age of 5 weeks. The etiological agent is a goose parvovirus (GPV) which is widespread in all major goose farming countries in Europe and Asia. At present, vaccination is the only method preventing the loss of animals. *In vitro* GPV replicates only in goose embryo fibroblasts (GEF) and this way the virus is propagated in order to obtain the material for diagnostic tests and vaccine production.

In this paper, we report the application of bioreactor Celligen Plus for GEF culture and Derzsy disease virus propagation. The method is based on immobilization and culture of cells on porous glass carriers in bioreactor. Comparing to the traditional cell culture techniques, the described method was over 12-fold more efficient and allowed to obtain good quality virus pool for Derzsy disease vaccine preparation.

Key words:

Derzsy's disease, bioreactor, goose parvovirus, GEF cells, porous glass carriers.

Adres do korespondencji

Wojciech Rzeski,
Zakład Wirusologii
i Immunologii,
Instytut Mikrobiologii
i Biotechnologii,
Uniwersytet
Marii Curie-Skłodowskiej,
ul. Akademicka 19,
20-033 Lublin.

1. Wprowadzenie

Choroba Derzsyego jest wirusową chorobą gęsi oraz kaczek Barbarie i Mullard, bardzo zakaźną o gwałtownym przebiegu kończącym się śmiercią głównie młodych ptaków, w wieku poniżej piątego tygodnia życia (1,2).

Wywołujący ją parwowirus (*Goose parvovirus*, GPV) jest małym, ikozaedralnym wirusem o średnicy 20-22 nm, należącym do rodziny *Parvoviridae* (3,4). Genomowy DNA parwowirusów jest jednoniciową cząsteczką o masie wahającej się pomiędzy $1,2-2,2 \times 10^6$ Da (5). Replikacja parwowirusów odbywa się w jądrze komórkowym intensywnie dzielących się komórek. Cykl życiowy parwowirusów jest jednak powolny. Adsorpcja na komórkach gospodarza następuje w ciągu 1-2 godzin, a okres eklipsy wynosi około 10-16 godzin. Synteza dojrzałych cząstek wirusa trwa kolejne 8-12 godzin. Całkowity cykl replikacyjny dojrzewającego w jądrze wirionu trwa zatem około 24-30 godzin (5,6).

W warunkach *in vitro* GPV namnaża się jedynie w hodowli fibroblastów zarodków gęsi (GEF), do sporządzenia, której służą zarodki gęsie dostępne w trwającym od stycznia do czerwca sezonie lęgowym.

Zwalczanie choroby Derzsyego polega na stosowaniu szczepień ochronnych. Do tego celu służy szczepionka zawierająca namnożony w hodowli GEF atenuowany wirus. Diagnostyka serologiczna choroby opiera się głównie na odczynie seroneutralizacji (SN), który wykonywany jest w hodowli GEF oraz na testach immunoenzymatycznych (ELISA) (1,7,8).

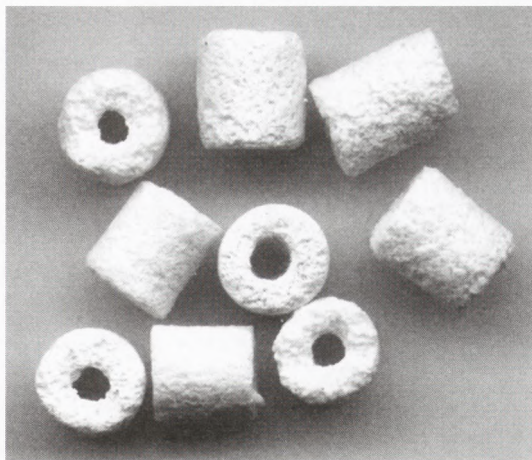
Do produkcji szczepionki i antygeny do testu SN i ELISA potrzebny jest wirus w dużej ilości.

Gęsi mają krótki okres lęgowy i w związku z tym konieczne jest opracowanie metody pozwalającej na uzyskanie dużych (pokrywających całoroczne zapotrzebowanie) ilości komórek GEF i wirusa do produkcji szczepionki oraz testów serologicznych.

Odpowiednią ilość komórek zwierzęcych można uzyskać hodując je na powierzchni porowatych nośników, które mają dużą powierzchnię dostępną dla komórek przy stosunkowo małej objętości. W prezentowanej pracy komórki GEF hodowano na nośnikach ze spiekanego szkła porowatego, które dzięki rozwiniętej powierzchni (około $0,4 \text{ m}^2/\text{g}$ nośnika) i porowatości (wielkość porów 2-3 razy większa od rozmiarów komórki) stwarzają dobre warunki do penetracji porów przez komórki i składniki odżywcze (9,10).

Celem pracy było zastosowanie hodowli komórek GEF immobilizowanych na spiekany szkło porowatym w bioreaktorze Celligen Plus*, do namnażania wirusa choroby Derzsyego i porównanie wydajności tego procesu z tradycyjną metodą hodowli komórek na szklanych powierzchniach płaskich.

* Bioreaktor Celligen Plus zakupiono ze środków Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej w ramach programu Bitech'95.



Fot. 1. Nośniki ze spiekane go szkła porowatego.

2. Materiały i metody badań

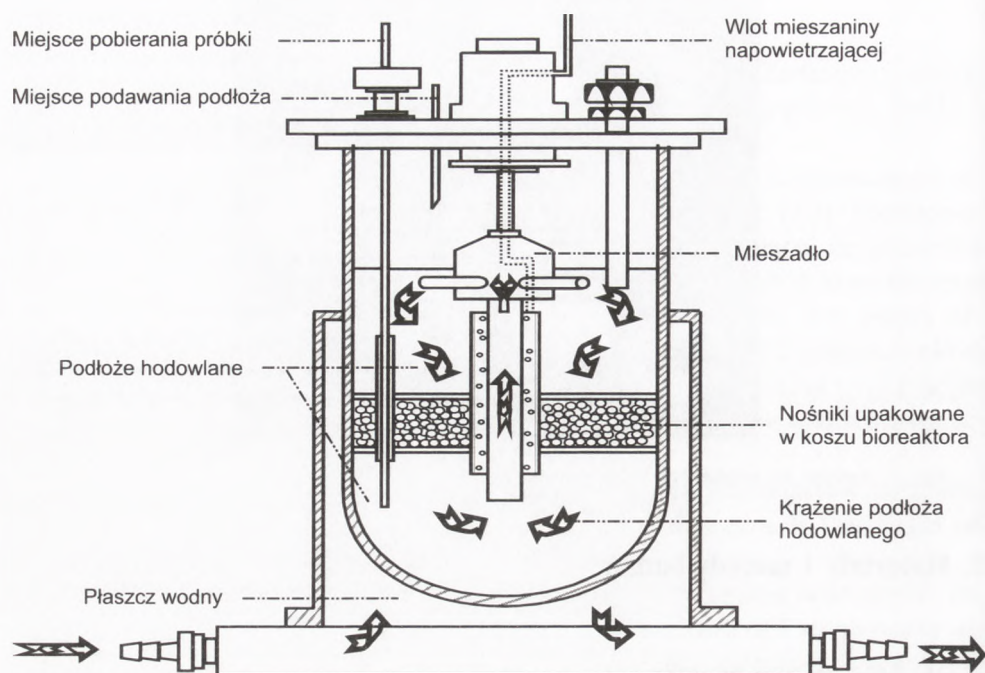
2.1. Bioreaktor i nośniki

W badaniach zastosowano bioreaktor Celligen Plus (firmy New Brunswick Scientific., CO., INC., Edison, NJ, USA) o objętości roboczej 1500 ml.

Powierzchnię do zakotwiczenia adherentnych komórek GEF stanowiło złożo ze spiekane go szkła porowatego o objętości 200 ml. Cylindryczne nośniki (fot. 1), o wymiarach 5/5-8/5 mm, o objętości wewnętrznej porów stanowiącej 53% całkowitej objętości, średnicy porów 180-480 μm i powierzchni całkowitej 0,4 m^2/gram nośnika, zaprojektowano i wykonano w Zakładzie Fizyki Chemicznej UMCS (11).

2.2. Hodowla komórek GEF i namnażanie wirusa choroby Derzsyego w bioreaktorze

Bioreaktor Celligen Plus wraz z upakowanym złożem nośników ze szkła porowatego sterylizowano w autoklawie pod ciśnieniem 0,075 MPa przez 20 minut. Następnie stabilizowano układ podłożem hodowlanym składającym się z 1200 ml płynu Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy cielęcej oraz antybiotyków (100 U/ml penicyliny, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycyny, 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amfoterycyny B). Po ustabilizowaniu podstawowych parametrów podłoża hodowlanego, takich jak temperatura (37°C), pH 7,3 i stężenie tlenu na poziomie 70% wysycenia podłoża powietrzem, wprowadzano do bioreaktora inokulum fibroblastów zarodka gęsi (GEF) o gęstości 2×10^6 komórek/ml i żywotności ponad 80%, zakażone wirusem choroby Derzsyego, zawie-



Rys. 1. Bioreaktor Celligen Plus z upakowanym złożem nośników porowatych.

szone w 200 ml podłoża hodowlanego. Zawiesinę komórek sporządzono z dziesięciu 12-14-dniowych zarodków gęsi, rutynową metodą trypsynizacji (12).

Komórki immobilizowano na nośnikach przez 3 godziny, przy wolnym mieszanii podłoża (25 obr/min). Po tym czasie zwiększono obroty mieszadła do 40 obr/min oraz ustawiono automatycznie regulowany (zmienny) przepływ mieszanki gazów (tlen, azot, dwutlenek węgla, powietrze) przez bioreaktor. Hodowlę prowadzono przez 144 godziny. Codziennie pobierano próbki podłoża w celu określenia miana wirusa uwolnionego z komórek GEF. Schemat działania bioreaktora Celligen Plus z upakowanym złożem nośników ze spiekane go szkła porowatego przedstawiono na rysunku 1.

W celu porównania wydajności hodowli bioreaktorowej, równolegle prowadzono hodowlę stacjonarną w butelkach o powierzchni 75 cm² wprowadzając inokulum komórek zakażonych wirusem o gęstości 4×10^6 /ml (10ml). W obu typach hodowli dawka wirusa użyta do zakażenia była identyczna (0,05 TCID₅₀/komórkę).

3. Analityka

Żywotność komórek GEF określano metodą barwienia 0,4% roztworem błękitu trypanu i wyrażano jako procent komórek żywych na ogólną liczbę komórek (13).

Miano namnożonego wirusa określano metodą Reeda i Muencha miareczkując próbki płynu hodowlanego z obu typów hodowli, na stacjonarnych hodowlach komórek GEF w mikropłytkach (14).

Wydajność procesu (WP) określano dzieląc całkowite miano namnożonego wirusa (MW) wyrażone w TCID₅₀/ml na ilość użytych zarodków (IZ) lub ilość komórek (IK) według wzorów: $WP = MW/IZ$ lub $WP = MW/IK$.

4. Wyniki badań i ich omówienie

Skutki zakażeń dużych populacji gęsi hodowlanych wirusem GPV, wywołującym chorobę Derzsyego, stanowią poważny problem ekonomiczny. Skuteczną metodą zapobiegania chorobie Derzsyego jest immunizacja ptaków szczepionką sporządzoną z atenuowanego parwowirusa. Opracowanie metod umożliwiających uzyskanie dużej ilości wirusa szczepionkowego może zmniejszyć koszt produkcji szczepionki oraz antygenów niezbędnych do sporządzania testów serologicznych, stosowanych do wykrywania wirusa w hodowlach gęsi.

W uzyskanych w tej pracy wynikach wykazano, że w hodowli bioreaktorowej można uzyskać większy w porównaniu z metodami klasycznymi końcowy zbiór wirusa (tab. 1 i 2). Przeliczając uzyskane miano wirusa (TCID₅₀/ml płynu hodowlanego) na 1 komórkę GEF jak i na 1 zarodek gęsi stwierdzono, że w hodowli bioreaktorowej GPV replikuje się wydajniej. Przypuszczamy, że warunki hodowli takie jak pH i stopień natlenienia stworzone w bioreaktorze były korzystniejsze do namnożenia komórek GEF, a także replikacji wirusa w trakcie 144-godzinnej hodowli, niż w hodowli stacjonarnej. W hodowli bioreaktorowej stwierdzono dwukrotne uwolnienie z komórek GEF dużych ilości dojrzałych cząstek wirusa. W początkowym okresie, między 48 a 72 godziną trwania hodowli stwierdzono wzrost miana wirusa związany z jego uwolnieniem z komórek (tab. 1). Po pierwszym wzroście miano wirusa ustabilizowało się aż do 144 godziny trwania hodowli, kiedy uzyskano maksymalny zbiór wirusa ($10^{5,75}$ TCID₅₀/ml). Natomiast w hodowli stacjonarnej stwierdzono stopniowy wzrost miana wirusa między 96 ($10^{4,38}$ TCID₅₀/ml) a 144 godziną hodowli ($10^{5,75}$ TCID₅₀/ml). Podczas całego doświadczenia nie stwierdzono kontaminacji hodowli bakteriami czy grzybami.

Tabela 1

Dynamika namnażania wirusa choroby Derzsyego w bioreaktorze oraz hodowli stacjonarnej

Czas inkubacji (godz.)	Liczba cząstek wirusa (log TCID ₅₀ /ml)	
	hodowla w bioreaktorze	hodowla stacjonarna
48	2,75	2,37
72	4,25	3,00
96	4,5	4,38
120	4,75	5,25
144	5,75	5,75

Tabela 2

Porównanie zbioru wirusa choroby Derzsyego namnożonego w bioreaktorze oraz w hodowli stacjonarnej

Rodzaj hodowli	Miano wirusa w TCID ₅₀ w przeliczeniu na 1 zarodek gęsi	Liczba cząstek wirusa w przeliczeniu na 1 komórkę GEF
w bioreaktorze	$6,95 \times 10^7$	1,74
stacjonarna	$5,7 \times 10^6$	0,14

Uzyskana w bioreaktorze Celligen Plus pula wirusa została wykorzystana w 1999 r. do przygotowania w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym w Puławach szczepionki przeciwko chorobie Derzsyego.

Zastosowanie bioreaktora umożliwiło ciągłą kontrolę i regulację parametrów procesu, bez potrzeby bezpośredniej ingerencji w środowisko hodowli. Ograniczono tym samym zagrożenie przypadkowego zakażenia hodowli i związanej z tym utraty wyjściowego materiału do przygotowania szczepionki. Miało to istotne znaczenie praktyczne, gdyż zarodki gęsie, służące do sporządzania wrażliwej na zakażenie wirusem choroby Derzsyego hodowli GEF dostępne były tylko przez około 5-6 miesięcy, tj. od stycznia do czerwca, w okresie nieśności gęsi. Uzyskana z tej pracy pula wirusa była wysokiej jakości i odpowiadała wymaganiom stawianym materiałom biologicznym przeznaczonym do produkcji szczepionek. Dwunastokrotnie wyższy zbiór wirusa z hodowli bioreaktorowej pozwolił na proporcjonalne zmniejszenie kosztów produkcji szczepionki przez zmniejszenie ilości zastosowanych zarodków gęsich i płynów hodowlanych.

5. Wnioski

1. Proces namnażania wirusa choroby Derzsyego w komórkach GEF, w bioreaktorze Celligen Plus o pojemności roboczej 1500 ml, z zastosowaniem upakowanego

złoża porowatych nośników pozwala na uzyskanie około 12-krotnie wyższej wydajności końcowego zbioru wirusa w porównaniu z klasycznymi hodowlami stacjonarnymi.

2. Zastosowanie bioreaktora pozwala również na zredukowanie kosztów procesu, a tym samym ceny szczepionki.

3. Hodowla w bioreaktorze ogranicza przypadkowe zakażenia, a także pozwala na utrzymanie stałych parametrów w czasie trwania procesu. Wiąże się to z uzyskaniem wysokiej jakości produktu końcowego.

Literatura

1. Alexandrov M., Alexandrova R., Alexandrov I., Zacharieva S., Lasarova S., Doumanova L., Peshev R., Donev T., (1999), *J. Virol. Methods*, 79, 21-32.
2. Brown K. E., Green S. W., Young N. S., (1995), *Virology*, 210, 283-91.
3. Kisary J., (1993), *Virus Infections of Vertebrates*, Eds. McFerran J. B., Mc Nulty M. S., Elsevier, Amsterdam, 4, 157-162.
4. Gough R. E., (1991), *Diseases of Poultry*, Eds. Calmek B. W., John Barnes H., Beard C. W., Reid W. M., Yoder H., Iowa State University Press, Ames, Iowa, 684-690.
5. Chroboczek J., Zagórski W., (1983), *Wirusologia molekularna*, PWN, 216-220.
6. Palinko-Biro E., Ronaszeki G., Merkle H. P., Gander B., (2001), *Int. J. Pharmaceut.*, 221, 153-157.
7. Jestin V., le Bras M., Cherbonnel M., le Gall G., Bennejean G., (1991), *Rec. Med. Vet.*, 167, 849-857.
8. Kardi V., Szegletes E., (1996), *Avian Pathol.*, 25, 25-34.
9. Rzeski W., Kandefler-Szerszeń M., Kaczor J., Dawidowicz A. L., Wozowicz A., (1993), *Acta Biotechnol.*, 13, 275-281.
10. Griffiths J. B., (1990), *Animal Cell Biotechnology*, Eds. Spier R. E., Griffiths J. B., Academic Press, London, 4, 149-166.
11. Dawidowicz A. L., Księżycki A., (1991), *Pat. RP*, nr 153 105.
12. Przesmycki F., (1963), *Zarys wirusologii praktycznej*, PZWL, Warszawa, 60-67.
13. Doyle A., Griffiths J. B., (1996), *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, England, 1, 4B, 5.
14. Przesmycki F., (1963), *Zarys wirusologii praktycznej*, PZWL, Warszawa, 45-50.