

УДК УДК 636.3[616:98+579.834]

В.В. Уховський^{1,*}, А.П. Палій^{2,3}, О.А. Тарасов¹, Т.М. Уховська¹, А.П. Палій³

Застосування гліцерину та ДМСО для кріоконсервування лептоспір *Leptospira Interrogans*

UDC УДК 636.3[616:98+579.834]

V.V. Ukhovskiy^{1,*}, A.P. Paliy^{2,3}, O.A. Tarasov¹, T.M. Ukhovska¹, A.P. Paliy³

Using of Glycerol and DMSO for *Leptospira interrogans* Cryopreservation

Ключові слова: лептоспіра, кріоконсервування, штам, серогрупа, серовар, гліцерин, ДМСО, рідкий азот, імуногенна активність.

Ключевые слова: лептоспира, крiоконсервирование, штамм, серогруппа, серовар, глицерин, ДМСО, жидкий азот, иммуногенная активность.

Key words: leptospira, cryopreservation, strain, serogroup, serovar, glycerol, DMSO, liquid nitrogen, immunogenic activity.

Лептоспіроз є одним із найпоширеніших зоонозних захворювань у світі. Показники його розповсюдження та кількість спалахів помітно зростають у багатьох країнах світу [8, 9]. Це, в свою чергу, завдає значних економічних збитків сільському господарству, оскільки знижується народжуваність та продуктивність тварин, а також збільшується їх смертність [3].

Лептоспіри достатньо чутливі до пошкоджуючої дії фізико-хімічних факторів – помірно високих температур (45–55°C), кислих та лужних значень рН [7], жовчі та шлункового соку [6], дезінфектантів [1, 2].

Питання довгострокового зберігання лептоспір набуває важливого значення для лабораторної діагностики лептоспірозу та розробки вакцинних препаратів. У процесі довгострокового культивування лептоспір на рідких живильних сироваткових середовищах їх патогенність та імуногенність значно знижуються [6]. Застосування рідкого азоту забезпечує збереження їх біологічних властивостей [5]. Встановлено, що лептоспіри володіють достатньо низькою кріорезистентністю [4]. На нашу думку, впровадження кріоконсервування лептоспір та підбір ефективних кріопротекторів дасть змогу вирішити основне питання щодо культивування лептоспір (збереження імуногенних властивостей та здатності до аглютинації).

Leptospirosis is one of the most common zoonotic diseases in the world, the incidence rates and the outbreak number of which are noticeably increasing in most countries worldwide [1, 3]. It causes significant economic losses in agriculture, affecting animal fertility, decreasing productivity, and also due to increasing the mortality rate [7].

However, *Leptospira* is very sensitive to the altering effects of physical and chemical factors including moderately high temperatures (45–55°C), acidic and alkaline pH values [6], bile and gastric juice [5], disinfectants [2, 9].

The question of long-term storage of *Leptospira* is important for the laboratory diagnosis of leptospirosis and for the vaccine preparations development. During the long-term *Leptospira* cultivation on liquid nutrient media containing sera, their pathogenicity and immunogenicity significantly decreased [5]. The usage of liquid nitrogen could ensure the preservation of their biological characteristics [4]. It was established that *Leptospira* considered to be a low cryoresistant material [8]. In our opinion, the applying of *Leptospira* cryopreservation and selection of effective cryoprotectants will allow to resolve the main issue for the microorganism cultivation particularly the preservation of immunogenic properties and ability to agglutination.

¹Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

²Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

³Харківський національний технічний університет сільського господарства імені Петра Василенка

¹Institute of Veterinary Medicine of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kyiv

²National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

³Kharkiv Petro Vasylenko National Technical University of Agriculture, Kharkiv, Ukraine

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Донецька, 30. м. Київ, Україна 03151;
тел.: (+38 067) 981-52-26, факс: (+38 044) 245-78-05
електронна пошта: uhovskiy@ukr.net

***To whom correspondence should be addressed:**

30, Donetska str., Kyiv, Ukraine 03151;
tel.: +380 67 981 5226, fax: +380 44 245 7805
e-mail: uhovskiy@ukr.net

Надійшла 19.08.2018

Прийнята до друку 18.02.2019

Received August, 19, 2018

Accepted February, 18, 2019

© 2019 V.V. Ukhovskiy et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Мета даної роботи – науково-експериментальне обґрунтування застосування демитилсульфоксиду та гліцерину у якості криопротекторів для зберігання лептоспір у рідкому азоті.

Дослідження проводили з використанням антигенів восьми серогруп патогенних лептоспір: *Sejroe* (штам 493 Poland), *Hebdomadis* (штам Kabura), *Tarassovi* (штам Perepelicyni), *Pomona* (штам Pomona), *Grippotyphosa* (штам Moskva V), *Canicola* (штам Hond Utrecht IV), *Icterohaemorrhagiae* (штам M 20), *Australis* (штам Yez bratislava). Вихідна концентрація кожної серогрупи становила (80 ± 5) млн кл/см³. Дані культури мікроорганізмів виділені, паспортизовані та зберігаються у музеї мікроорганізмів Інституту ветеринарної медицини НААН (м. Київ).

Використання гліцерину та диметилсульфоксиду (ДМСО) у концентраціях 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 та 20,0% обумовлене їх дешевизною та безпечністю під час роботи.

Отримані розведення криоконсервуючих речовин вносили в ампули по 2 см³, з кожного розведення використовували по дві ампули. Спочатку охолодження проводили у холодильнику за температури 4°C при експозиції 60 хв, далі заморожували у морозильній камері за температури -20°C при експозиції 60 хв; охолоджували у парах рідкого азоту протягом 20 хв; на останньому етапі заморожували у посудині Дьюара (на весь термін досліду – один календарний рік). Перед посівом на живильне середовище за кімнатної температури розморожували ампули протягом 20 хв. Для посіву до 1,0 см³ розведеної культури додавали 9 см³ середовища Кортгофа (рН 7,3), яке містить 5% кролячої сироватки крові, результати отримували через 10 діб (табл. 1).

Результати криоконсервування культур восьми серогруп патогенних лептоспір із гліцерином показали, що для даної речовини найбільш придатною є концентрація 10 % (табл. 1). За інших концентрацій гліцерину (1,0; 2,5; 5,0 та 20%) накопичення культур лептоспір було значно меншим або взагалі не спостерігалось. Серед серогруп лептоспір виявлялися поодинокі мікроорганізми у темному полі зору мікроскопа.

Результати криоконсервування культур восьми штамів патогенних лептоспір із використанням ДМСО показали, що найбільш придатною є концентрація 5,0 % (табл. 1). За концентрації 20% ДМСО ріст лептоспір не спостерігався, а за 1,0; 2,5 та 10% відмічалось накопичення лептоспір від 10–20 млн кл/см³, що свідчить про низьку збереженість культури після криоконсервування з ДМСО.

The purpose of this work was scientific and experimental evaluation of dimethyl sulfoxide and glycerol using as cryoprotectants for *Leptospira* storing in liquid nitrogen.

Investigations were performed using antigens of eight serogroups of pathogenic *Leptospira*: *Sejroe* (strain 493 Poland), *Hebdomadis* (strain Kabura), *Tarassovi* (strain Perepelicyni), *Pomona* (strain Pomona), *Grippotyphosa* (strain Moskva V), *Canicola* (strain Hond Utrecht IV), *Icterohaemorrhagiae* (strain M 20), *Australis* (strain Yez bratislava). The initial concentration of each was (80 ± 5) million cells/cm³. These cultures of microorganisms were isolated, passportized and stored in the Museum of Microorganisms of the Institute of Veterinary Medicine of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine (Kyiv).

The usage of these chemical compounds was based on low cost and safety during operation. As cryoprotectants there were used glycerol and dimethyl sulfoxide (DMSO) at concentrations of 1.0; 2.5; 5.0; 10.0% and 20.0%.

The obtained dilutions of cryoprotectants were inoculated into ampoules of 2 cm³ volume, from each dilution two ampoules were used. First cooling was carried out in a refrigerator at 4°C for 60 min; then it was frozen in the freezer at -20°C for 60 min; subsequently cooled in liquid nitrogen vapor for 20 min; at the last stage, the material was frozen in a Dewar vessel (for the experiment duration of one calendar year). Before inoculation of the medium, the ampoules were thawed for 20 minutes under room temperature condition. For microbiological culturing 1.0 cm³ of a diluted culture was supplemented with 9 cm³ of Kortgoff medium (pH 7.3) (containing 5% rabbit blood serum) and after 10 days the results were observed (Table 1).

The cryopreservation results for the cultures of eight serogroups of pathogenic *Leptospira* with glycerol (Table 1) revealed that 10% concentration was the most suitable for this substance. With other concentrations of glycerol (1.0; 2.5; 5.0, as well as 20%) the *Leptospira* cultures accumulation was significantly less or not observed at all. Among the leptospiral serogroups, the single microorganisms were observed in the dark field of view of microscope.

The cryopreservation results of cultures of eight pathogenic *Leptospira* strains using DMSO showed (Table 1) that the 5.0% concentration was the most appropriate. With 20% DMSO concentration, there was no growth of *Leptospira*, and at concentrations of 1.0; 2.5 and 10% there was observed the *Leptospira* accumulation from 10 to 20 million cells /cm³, which indicated low preservation rate of the *Leptospira*

Таблиця 1. Результати накопичення восьми серогруп патогенних лептоспір після криоконсервування з розчином гліцерину та ДМСО, %

Table 1. Results of accumulation of eight serogroups of pathogenic leptospires after cryopreservation with glycerol and DMSO solution, %

Штам лептоспір Leptospira strain	Концентрація розчинів Solution concentration									
	1,0		2,5		5,0		10		20	
	Гліцерин Glycerol	ДМСО DMSO	Гліцерин Glycerol	ДМСО DMSO	Гліцерин Glycerol	ДМСО DMSO	Гліцерин Glycerol	ДМСО DMSO	Гліцерин Glycerol	ДМСО DMSO
493 Poland	–	10	–	*	–	40	60	10	–	–
Kabura	–	10	–	–	–	40	50	10	–	–
Perepelicyuni	*	20	–	10	–	60	60	20	–	–
Pomona	*	10	–	10	–	50	50	30	–	–
Moskva V	–	10	10	5	10	40	60	20	*	–
Hond Utrecht IV	–	10	–	10	–	40	60	*	–	–
M 20	*	–	–	–	–	50	60	10	–	–
Yez bratislava	–	10	–	–	–	50	50	10	–	–

Примітка: «–» – відсутність лептоспір у полі зору мікроскопа; «*» – поодинокі лептоспіри у полі зору мікроскопа; 10–60 – показник накопичення лептоспір, млн кл/см³.

Note: «–» – absence of *Leptospira* in the field of view of microscope; «*» – single *Leptospira* in the field of view of microscope; 10–60 – index of *Leptospira* accumulation, million cells/cm³.

Після встановлення оптимальних концентрацій ДМСО (5,0%) та гліцерину (10%) нами було вивчено антигенні властивості штамів патогенних лептоспір після довготривалого культивування (рік) за низьких температур. Після отримання та накопичення придатного для проведення серологічної реакції матеріалу (не менше 70 млн кл/см³) культури лептоспір, піддані довготривалому заморожуванню, перевіряли за допомогою реакції мікроаглютинації з гомологічними аглютинуючими лептоспірозними сироватками з використанням комерційного набору «Набор сывороток групповых агглютинирующих лептоспирозных» («Армавирская биофабрика», Росія). Розведену сироватку, в якій спостерігалася половинна аглютинація лептоспір, брали за титр антигена, який досліджувався.

З метою порівняння антигенних властивостей також були перевірені вихідні штами лептоспір, які зберігалися протягом року в умовах безперервного культивування на рідкому живильному середовищі з додаванням 10% сироватки крові овець (середовище Кортгофа) (періодичність пересівів становила 10–14 діб) (табл. 2).

Показники вихідних титрів штамів лептоспір коливалися від 1:16 000 (Kabura) до 1:64 000 (Moskva V та Yez bratislava). Через рік після безперервного

culture during cryopreservation with DMSO.

After establishing the optimal concentrations of DMSO (5.0%) and glycerol (10%), we studied the changes in pathogenic *Leptospira* strains antigenic properties during long-term cultivation (one year) at low temperatures. After obtaining and leptospira culture accumulating in amount required for serological test (at least 70 mln cells/cm³), after long-term freezing, the cultures were controled by microagglutination test using homologous agglutinating leptospirosis sera from the commercial kit 'Set of agglutinating *Leptospira* groups sera' ('Armavir Biofactory', Russia). The diluted serum, where observed the half-agglutination of leptospires, was taken for the titration of the studied antigen.

In order to compare the antigenic properties, the parent *Leptospira* strains were also tested, which persisted for a year under continuous cultivation on a liquid nutrient medium supplemented with 10% sheep blood serum (Kortgoff medium) (subculture term was 10–14 days) (Table 2).

Indices of the initial titers of *Leptospira* strains ranged from 1:16 000 (Kabura) to 1:64 000 (Moskva V and Yez bratislava). One year after the continuous cultivation of *Leptospira* on a liquid serum medium, the agglutination titers to *Leptospira* decreased by 4.2 times on average. In our opinion, this is due to



Таблиця 2. Аглотинаційні титри до штамів патогенних лептоспір за різних умов зберігання (заморожування та культивування на рідкому сироватковому середовищі)

Table 2. Agglutinating titers of pathogenic *Leptospira* strains under various storage conditions (freezing and cultivation in liquid serum medium)

Серогрупа лептоспір <i>Leptospira</i> serogroup	Вихідний титр Starting titer	Аглотинаційні титри Agglutinating titer		
		Заморожування з додаванням 5% ДМСО Freezing with 5% DMSO	Заморожування з додаванням 10% гліцерину Freezing with 10% glycerol	Безперервне культивування на рідкому середовищі Continuous recultivating in liquid medium
493 Poland	1:32000	1:32000	1:16000	1:8000
Kabura	1:16000	1:16000	1:16000	1:4000
Perepelicyni	1:32000	1:32000	1:32000	1:8000
Pomona	1:32000	1:32000	1:32000	1:4000
Moskva V	1:64000	1:32000	1:32000	1:16000
Hond Utrecht IV	1:32000	1:32000	1:32000	1:16000
M 20	1:32000	1:32000	1:32000	1:8000
Yez bratislava	1:64000	1:64000	1:64000	1:16000

культивування лептоспір на рідкому сироватковому середовищі аглютинаційні титри до лептоспір у середньому знизилися в 4,2 рази. Ми вважаємо, це пов'язано з такими факторами: дисоціацією лептоспір, змінним складом живильного середовища (застосовуються різні серії сироваток крові кролів або овець), несвоєчасним пересівом та контактом культури з киснем. На думку багатьох дослідників, антигенність та аглютинабельність лептоспір є однією з найбільш варіабельних властивостей лептоспір.

На відміну від безперервного способу культивування лептоспір через рік після заморожування культур із різними кріопротекторами значного зниження аглютинаційних титрів до лептоспір не спостерігали. Так, під час заморожування культур лептоспір із додаванням 10% гліцерину аглютинаційні титри знизилися (у 2 рази) лише у штамів 493 Poland (серогрупа Sejroe) та Moskva V (серогрупа Grippotyphosa). У випадку застосування кріопротектора ДМСО аглютинаційні титри знизилися (у 2 рази) лише у штамі Moskva V (серогрупа Grippotyphosa). Незначне зниження аглютинаційних титрів штамів лептоспір під час довготривалого заморожування можна пов'язати з тим, що нам необхідно було провести 3 пересіви культур лептоспір на рідкому сироватковому середовищі з метою накопичення, придатного для постановки серологічної реакції (не менше 70 млн кл/см³).

Отже, за результатами проведених досліджень, ми можемо стверджувати, що з метою довготри-

some factors: dissociation of *Leptospira*, variable composition of the nutrient medium (different series of rabbit or sheep blood sera were used), untimely recultivating and contact of the culture with atmospheric oxygen. According to many researchers opinion, the antigenicity and agglutinability of *Leptospira* is one of the most variable properties of the microorganism.

In contrast to the continuous method of *Leptospira* cultivation, one year after the cultures freezing with different cryoprotectants, no significant decrease in agglutination titers was observed. Thus, during the freezing of *Leptospira* cultures with 10% glycerol, the agglutination titers decreased (by two times) only for strains 493 Poland (Sejroe serogroup) and Moskva V (Grippotyphosa serogroup). When using the DMSO cryoprotectant, agglutination titers decreased (by two times) only for Moskva V strain (Grippotyphosa serogroup). Insignificant decrease of agglutination titers of *Leptospira* strains during long-time freezing can be attributed to the fact that we had to carry out 3 cultivations of *Leptospira* cultures on a liquid serum medium in order to obtain the accumulation required for a serological test (at least 70 million cells/cm³).

According to our findings, we can state that for the long-term storage of *Leptospira*, it is necessary to conduct low-temperature freezing of cultures using glycerol and DMSO as cryoprotectants. This method of long-term storage of *Leptospira* will help to avoid the issues associated with a decrease of antigenic properties of *Leptospira*, which, in turn, will significantly reduce the worktime for *Leptospira* antigenicity recovery (perio-

вало зберігання лептоспир необхідно проводити низькотемпературне заморожування культур із використанням у якості криопротекторів гліцерину та ДМСО. Цей метод довготривалого зберігання лептоспир дозволить уникнути проблем, пов'язаних зі зниженням антигенних властивостей лептоспир, що, у свою чергу, значно зменшить обсяг робіт із підвищення антигенності лептоспир (періодичне зараження лабораторних тварин) і пересіву лептоспир, а також знизить потенційні ризики зараження лептоспірозом працівників лабораторій.

Таким чином встановлено, що для криоконсервування культур лептоспир малого ряду найбільш придатною є концентрація розчину для гліцерину – 10 %, а для ДМСО – 5,0 %.

Результати досліджень будуть використані для криоконсервування культур лептоспир, які зберігаються у лабораторії лептоспірозу з музеєм мікроорганізмів Інституту ветеринарної медицини НААН.

Література

1. Григорьев ИИ. Об устойчивости лептоспир и их сохраняемости во внешней среде. Ветеринария. 1955; (9): 48–9.
2. Завгородній АІ, Стегній БТ, Палій АП, та ін. Наукові та практичні аспекти дезінфекції у ветеринарній медицині. Харків; 2013. 222 с.
3. Задорожна ВІ, Протас СВ, Гопко НВ, та ін. Епізоотологічні та епідеміологічні аспекти лептоспірозу в Україні. Київ: Компринт; 2014. 46 с.
4. Зайцев ВВ, Усов ЮП, Дремач ГЭ. Криоконсервация лептоспир. Ученые Записки Учреждения образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины». 2012; 48 (2): 69–72.
5. Малахов ЮА, Панин АП, Соболева ГЛ. Лептоспироз животных. Ярославль: ДУА-пресс; 2001. 548 с.
6. Недосеков ВВ, Уховский ВВ, Кучерявенко ОО. Лептоспироз сільськогосподарських тварин. Київ: Компринт; 2011. 140 с.
7. Шуляк БФ. Лептоспироз собак. Ветеринария сельскохозяйственных животных. 2007; (6): 20–6.
8. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infectious Diseases. 2003; (3): 757–71.
9. Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. Clinical Microbiology Infection. 2011; (17): 494–501.

dically passaging through laboratory animals) and cultivation of *Leptospira*, as well as reduce the potential risks of infection with leptospirosis of laboratory staff.

Thus, it was established that for cryopreservation of *Leptospira* cultures of a small diagnostic selection, the most suitable concentration is 10.0% for glycerol, and 5.0% for DMSO.

These findings will be used for cryopreservation of Leptospira cultures, which are stored in the laboratory of leptospirosis with the Museum of Microorganisms of the Institute of Veterinary Medicine of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine.

References

1. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infectious Diseases. 2003; (3): 757–71.
2. Grigoriev II. [On the stability of leptospira and their conservation in the external environment]. Veterinariya. 1955; (9): 48–9. Russian.
3. Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. Clin Microbiol Infect. 2011; (17): 494–501.
4. Malakhov YuA, Panin AP, Soboleva GL. [Leptospirosis of animals]. Yaroslavl: DIA-press; 2001. 548 p. Russian.
5. Nedosekov VV, Ukhovskiy VV, Kucheryavenko OO. [Leptospirosis of farm animals]. Kyiv: Comprint; 2011. 140 p. Ukrainian.
6. Shulyak BF. [Leptospirosis of dogs]. Veterinariya Sel'skokhozyaystvennykh Zhivotnykh. 2007; (6): 20–6. Russian.
7. Zadorozhna VI, Protas SV, Hoptko NV, et al. [Epizootological and epidemiological aspects of leptospirosis in Ukraine]. Kyiv: Comprint; 2014. 46 p. Ukrainian.
8. Zaitsev VV, Usov YuP, Dremach GE. [Cryopreservation of leptospira]. Uchenyye Zapiski Uchrezhdeniya obrazovaniya «Vitebskaya Gosudarstvennaya Akademiya Veterinarnoy Meditsiny». 2012; 48 (2): 69–72. Russian.
9. Zavgorodniy AI, Stegnyy BT, Paliy AP, et al. [Scientific and practical aspects of disinfection in veterinary medicine]. Kharkiv; 2013. 222 p. Ukrainian.

