

УДК 57.043;578.71

М.Ю. Стегний<sup>1\*</sup>, Б.Т. Стегний<sup>1</sup>, А.Н. Гольцев<sup>2</sup>

## Ультраструктура и биологические свойства вируса инфекционного бронхита птиц после криоконсервирования

UDC 57.043;578.71

M.Yu. Stegnyy<sup>1</sup>, B.T. Stegnyy<sup>1</sup>, A.N. Goltsev<sup>2</sup>

### Ultrastructure and Biological Properties of Avian Infectious Bronchitis Virus Following Cryopreservation

**Реферат:** В работе исследованы ультраструктура и инфекционная активность вируса инфекционного бронхита птиц (IBV) после криоконсервирования и низкотемпературного хранения при  $-20$ ,  $-70$  и  $-196^{\circ}\text{C}$  в течение различных временных промежутков (от 3 суток до 8 лет) с помощью электронной микроскопии, серологических и вирусологических методов. Показано, что чем ниже температура хранения криоконсервированных вирусов, тем лучше сохраняется их ультраструктура и биологические свойства. Ультраструктурные изменения IBV после продолжительного хранения в условиях умеренно низкой температуры ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) выражались в нарушении целостности липопротеидной оболочки вирионов; утраты гликопротеидной «короны» у большинства вирионов; конформационной дестабилизации оболочки и нуклеокапсида. После хранения образцов IBV при  $-70$  и  $-196^{\circ}\text{C}$  большая часть вирионов сохраняла электрический заряд и пепломеры «короны» в течение срока наблюдения. Нарушение целостности липопротеидной оболочки и структуры наблюдалось не более чем у 10% вирионов от общего их числа.

**Ключевые слова:** вирус инфекционного бронхита птиц, морфология, ультраструктура, вирион, криоконсервирование, криобанк, криоповреждения.

**Реферат:** У роботі досліджено ультраструктуру та інфекційну активність вірусу інфекційного бронхіту птахів (IBV) після криоконсервування та низькотемпературного зберігання при  $-20$ ,  $-70$  та  $-196^{\circ}\text{C}$  впродовж різних часових проміжків (від 3 діб до 8 років) за допомогою електронної мікроскопії, серологічних та вірусологічних методів. Показано, що чим нижча температура зберігання криоконсервованих вірусів, тим краще зберігається їх ультраструктура та біологічні властивості. Ультраструктурні зміни IBV після тривалого зберігання в умовах помірно низької температури ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) виражалися у порушенні цілісності ліпопротеїдної оболонки віріонів; втраті глікопротеїдної «корони» у більшості віріонів; конформаційній дестабілізації оболонки та нуклеокапсиду. Після зберігання зразків IBV при  $-70$  та  $-196^{\circ}\text{C}$  більша частина віріонів зберігала електричний заряд і пепломери «корони» впродовж терміну спостереження. Порушення цілісності ліпопротеїдної оболонки та структури спостерігалося не більш ніж у 10% віріонів від загальної їх кількості.

**Ключові слова:** вірус інфекційного бронхіту птахів, морфологія, ультраструктура, віріон, криоконсервування, криобанк, криошкодження.

**Abstract:** The authors investigated ultrastructure and infectious activity of avian infectious bronchitis virus following cryopreservation and low temperature storage at  $-20$ ,  $-70$  and  $-196^{\circ}\text{C}$  during various terms from 3 days up to 8 years using electron microscopy, serologic and virusologic methods. It was shown that the lower was the storage temperature of cryopreserved viruses, the higher was the preservation of their ultrastructure and biological properties. Ultrastructure changes in IBV following long-term storage at moderate low temperatures ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) included the damages of virion lipoprotein membrane, loss of glycoprotein 'crown' in most virions, conformational destabilization of membrane and nucleocapsid. Following storage of IBV at  $-70$  and  $-196^{\circ}\text{C}$  the most virions retained electric charge and the 'crown' peplomers during whole observation term, damaged lipoprotein envelope and compromised structure were found only in 10% of total virions.

**Key words:** avian infectious bronchitis virus, morphology, ultrastructure, virion, cryopreservation, cryobank, cryodamage.

Важной задачей для понимания механизмов криоповреждения вирусов является выявление вклада в эти процессы нарушения их ультраструктуры. Применение современных электронно-микроскопических методов позволяет оценить структурные нарушения вирионов, которые могут быть вызваны криоконсервированием [7, 10] и длительным хранением. Перестройки и поврежде-

An important task for understanding the mechanisms of cryodamage in viruses is to identify the contribution of their ultrastructure disorder into these processes. Applying the contemporary electron microscopy methods enables the evaluation of structural disorders in virions which can be resulted from cryopreservation [7, 10] and long-term storage. Rearrangements and damage of either DNA or RNA of the

<sup>1</sup>Лаборатория биотехнологии; отдел изучения болезней птиц, Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Пушкинская, 83, г. Харьков, Украина 61023; тел.: (+38 057) 707-20-38, факс: (+38 057) 707-10-90, электронная почта: marina.stegnyy@gmail.com

Поступила 15.05.2015

Принята в печать 21.09.2015

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №4. – С. 340–349. © 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

<sup>1</sup>Laboratory of Biotechnology, Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed:

83, Pushkinskaya Str., Kharkov, Ukraine 61023; tel.: +38057 707 2038, fax: +38057 707 1090 e-mail: marina.stegnyy@gmail.com

Received May, 15, 2015

Accepted September, 21, 2015

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25(4): 340–349.

© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

ния ДНК или РНК вирусов могут быть причиной изменения свойств вирусосодержащего биологического материала.

Выделенные во время вспышек инфекционных заболеваний животных штаммы вирусов сохраняются в криобанке Национального научного центра «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» (ННЦ ИЭКВМ) для дальнейшего изучения их биологических свойств, патентования, разработки средств профилактики и терапии вирусных инфекций животных [11]. Вирусы инфекционного бронхита птиц являются частью Коллекции патогенов ННЦ ИЭКВМ, которой присвоен статус Национального достояния Украины.

Вирус инфекционного бронхита птиц (IBV) – первый описанный в литературе коронавирус птиц, который выделили J.R. Beach и O.W. Shalk в 1936 г. Этот вирус согласно классификации Международного комитета по таксономии вирусов 2008 г. относится к семейству коронавирусов (*Coronaviridae*), подсемейству *Coronavirinae*, роду *Gamma coronavirus* и поражает в основном кур всех возрастных групп. У людей коронавирусы вызывают острые респираторные и кишечные заболевания.

До изменений, внесенных в таксономию коронавирусов в 2008 г., не было подсемейств, а род *Coronavirus* считали филогенетической группой [16]. По мере углубления знаний относительно молекулярно-генетических свойств коронавирусов усовершенствовалась их классификация, были выделены новые таксономические единицы, в том числе и виды, опасные для человека, например возбудитель атипичной пневмонии SARS-CoV, который относится к роду *Beta coronavirus* подсемейства *Coronavirinae* [9]. Этот коронавирус появился в 2002 г.: тогда во всем мире заболело около 8 000 человек и умерло 774. Новый опасный коронавирус MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) назван так из-за того, что выявлен как возбудитель респираторных инфекций на Ближнем Востоке в июне 2012 г. Полное понимание пути передачи вируса от животных к людям отсутствует, однако предполагают, что верблюды являются основным резервуарным хозяином вируса ближневосточного респираторного синдрома (БВРС-КоВ) и источником заражения людей.

К вирусу инфекционного бронхита птиц IBV человек также восприимчив. При этом заболевание протекает с симптомами легкого поражения верхних дыхательных путей [12]. У птиц вирус вызывает респираторный, нефрозо-нефритный и репродуктивный синдромы [1].

Высокая летальность от инфекционного бронхита наблюдается у цыплят, недостигших месячного возраста, до 90%, у 2–3-месячных цыплят –

вирусы могут вызвать изменения в свойствах вируссодержащего биологического материала.

Вирусные штаммы, выделенные во время вспышек инфекционных заболеваний животных, хранятся в криобанке Национального научного центра «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» (ННЦ ИЭКВМ) для дальнейшего изучения их биологических свойств, патентования, разработки средств профилактики и терапии вирусных инфекций животных [11]. Вирусы инфекционного бронхита птиц являются частью Коллекции патогенов ННЦ ИЭКВМ, которой присвоен статус Национального достояния Украины.

Авиан инфекционный бронхит вирус (IBV) – первый описанный в литературе коронавирус птиц, который выделили J.R. Beach и O.W. Shalk в 1936 г. Этот вирус согласно классификации Международного комитета по таксономии вирусов 2008 г. относится к семейству коронавирусов (*Coronaviridae*), подсемейству *Coronavirinae*, роду *Gamma coronavirus* и поражает в основном кур всех возрастных групп. У людей коронавирусы вызывают острые респираторные и кишечные заболевания.

До изменений, внесенных в таксономию коронавирусов в 2008 г., не было подсемейств, а род *Coronavirus* считали филогенетической группой [14]. По мере углубления знаний относительно молекулярно-генетических свойств коронавирусов усовершенствовалась их классификация, были выделены новые таксономические единицы, в том числе и виды, опасные для человека, например возбудитель атипичной пневмонии SARS-CoV, который относится к роду *Beta coronavirus* подсемейства *Coronavirinae* [9]. Этот коронавирус появился в 2002 г.: тогда во всем мире заболело около 8 000 человек и умерло 774. Новый опасный коронавирус MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) назван так из-за того, что выявлен как возбудитель респираторных инфекций на Ближнем Востоке в июне 2012 г. Полное понимание пути передачи вируса от животных к людям отсутствует, однако предполагают, что верблюды являются основным резервуарным хозяином вируса ближневосточного респираторного синдрома (БВРС-КоВ) и источником заражения людей.

К вирусу инфекционного бронхита птиц IBV человек также восприимчив. При этом заболевание протекает с симптомами легкого поражения верхних дыхательных путей [12]. У птиц вирус вызывает респираторный, нефрозо-нефритный и репродуктивный синдромы [1].

Высокая летальность от инфекционного бронхита наблюдается у цыплят, недостигших месячного возраста, до 90%, у 2–3-месячных цыплят –



до 35%. Респираторный синдром у молодняка проявляется кашлем, конъюнктивитом, ринитом, синуситом. Репродуктивный синдром, как правило, регистрируется у кур старше 6 месяцев и протекает хронически в ассоциации с колибактериозом и микоплазмозом, характеризуется снижением яйценоскости на 30–80%, а также появлением деформированных мелких яиц. Таким образом, из вышесказанного следует, что коронавирусы играют важную роль в инфекционной патологии человека и животных и способны преодолевать видовой барьер.

Коронавирусы, как и ортомиксо- и парамиксовирусы, содержат липопротеидную оболочку, однако, в отличие от них, коронавирусы не связываются с рецепторами, содержащими сиаловую кислоту и не проявляют нейраминидазную активность [3]. Отличительными признаками семейства *Coronaviridae* являются средний размер вирионов (от 80 до 160 нм); наличие РНК; мембраны, содержащей липиды; плеоморфная форма вирионов с характерной короной из булавовидных выступов.

Рибонуклеиновая кислота коронавирусов длиной от 16 до 21 нм выполняет функцию матричной и информационной РНК, поэтому она инфекционна при введении в эукариотическую клетку. Антигенные свойства вируса ассоциированы с шипами вирусной оболочки [9]. Гемагглютининэстеразный протеин формирует пепломеры оболочки вируса. Вирус имеет два гликопротеина поверхностный (S) и мембранный (M). Спайк-протеин (S) участвует в прикреплении к клетке, гемагглютинации, слиянии мембран и образовании вируснейтрализующих антител [8]. Белки вируса отличаются по тропизму к тканям. Известно, что изменение патогенности штаммов вируса связано с изменением изоэлектрических точек их белков. Классификация белков на основе изоэлектрических точек позволяет идентифицировать высокопатогенные и персистентные штаммы. На поверхности вируса обнаружено пять антигенных эпитопов (A, B, C, D, E), четыре из которых ответственны за его нейтрализацию.

Поскольку все существующие методы долгосрочного хранения вирусов в национальных и международных коллекциях предполагают наличие этапа замораживания вируссодержащего материала (низкотемпературное консервирование при  $-70$  и  $-80^{\circ}\text{C}$ , при температурах жидкого азота или высушивание из замороженного состояния – лиофилизация), то целью наших исследований была оценка нарушений структурной целостности вирионов, в частности вирусных оболочек и нуклеокапсида при их криоконсервировании и низкотемпературном хранении, на примере вируса инфекционного бронхита птиц IBV.

with a reduced egg production by 30–80%, as well as the appearance of deformed small eggs. Thus, from the foregoing it can be concluded that the coronaviruses play an important role in infectious pathology of humans and animals and are capable of overcoming the species barrier.

Coronaviruses as well as orthomyxo- and paramyxoviruses possess a lipoprotein envelope, but, unlike them, the coronaviruses do not bind to the receptors containing the sialic acid and do not exhibit a neuraminidase activity [3]. The features of the family *Coronaviridae* are: average size of virions from 80 to 160 nm; the presence of RNA; a membrane comprising the lipids; pleomorphic form of virions with a characteristic crown of clavate crests.

Ribonucleic acid of the coronaviruses with the length from 16 to 21 nm serves as a matrix/information RNA, however it is infectious when introduced into eukaryotic cell. The virus antigenic properties are associated with the spikes of the viral envelope [9].

Haemagglutinin esterase protein forms the peplomers of viral envelope. The virus has two glycoproteins: surface (S) and membrane (M) ones. Spike protein S is involved into the attachment to a cell, hemagglutination, membrane fusion and formation of virus neutralizing antibodies [8]. The virus proteins differ in tropism to the tissues. The change of pathogenicity of strains is known to be associated with alterations in isoelectric points of their proteins. Classification of proteins based on isoelectric points allows the identification of highly pathogenic and persistent strains. Five antigenic epitopes have been detected on the virus surface (A, B, C, D, E), four of those are responsible for its neutralization.

Since all the existing methods of long-term storage of viruses in national and international collections suggest the freezing of virus-containing material (low-temperature preservation at  $-70$  and  $-80^{\circ}\text{C}$ , at temperatures of liquid nitrogen or freeze-drying, *i. e.* lyophilization), the aim of our study was to assess the disorders in structural integrity of the virions, in particular viral shells and nucleocapsid during their low temperature storage using avian infectious bronchitis virus IBV as an example.

### Materials and methods

The research object was the avian IBV strain of the Massachusetts type, obtained from the collection of the Department of Avian Viral Diseases of the IECVM. Freezing and storage of the collection samples of extra-embryonic virus-containing liquid were performed in a domestic refrigerator ( $(-20 \pm 0.1)^{\circ}\text{C}$ ), low-temperature freezer ( $(-70 \pm 0.4)^{\circ}\text{C}$ ), liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) for various time periods: from 3 days and up to 8 years. Viruses are known to be generally



## Материалы и методы

Объектом исследования был вирус инфекционного бронхита птиц IBV (штамм Массачусетс), полученный из коллекции вирусов отдела изучения болезней птиц ННЦ «ИЭКВМ». Замораживание и хранение коллекционных образцов вирусосодержащей экстраэмбриональной жидкости осуществлялось в условиях бытового холодильника ( $(-20 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ ), низкотемпературного холодильника ( $(-70 \pm 0,4)^\circ\text{C}$ ), температуры жидкого азота ( $-196^\circ\text{C}$ ) в течение различных промежутков времени: от 3-х суток до более 8 лет. Известно, что вирусы в целом более устойчивы к действию факторов внешней среды и криоконсервирования, поэтому во многих лабораториях и на предприятиях биологической промышленности для хранения вирусов используют умеренно низкие температуры ( $-20... -22^\circ\text{C}$ ). Это и обусловило выбор диапазона режимов криоконсервирования и хранения вирусного материала. Вирусосодержащую жидкость расфасовывали в криопробирки («Nunc», Дания) объемом 1,8 и 2,0 см<sup>3</sup>. Охлаждение образцов биоматериала до температуры жидкого азота осуществляли с помощью программного замораживателя биологических объектов (ЗПМ-1) с электронным блоком управления (СКТБ с ОП при Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины); скорость охлаждения составляла 300–400 град/мин. В других случаях образцы охлаждали в камере холодильника. Температурный режим контролировали с помощью термодатчика, помещенного в замораживаемый объект, и по показаниям низкотемпературного термометра. Хранение замороженных в жидком азоте вирусов осуществляли в сосудах Дьюара. Образцы медленно отогревали на воздухе или в течение 1–2 мин на водяной бане при температуре 38...39°C.

Титры инфекционной активности IBV определяли титрованием на 9–10-дневных куриных эмбрионах, вычисляя эмбриональную инфицирующую дозу вируса (ЭИД<sub>50/мл</sub>) по стандартной методике [2].

Титры гемагглютинации IBV исследовали в реакции гемагглютинации по методу В.Н. Сюрин и соавт. [12]. Изучение влияния умеренно низких температур и глубокого охлаждения на ультраструктуру вирусов IBV проводили с использованием электронно-микроскопических исследований. Образцы инактивировались 0,5%-м раствором формальдегида. Проверка полноты инактивации была проведена методом трех последовательных пассажей в куриных эмбрионах 9-суточного возраста. В случае отсутствия инфекционной активности вируса образцы использовали для электронно-микроскопических исследований.

more resistant to environmental and cryopreservation factors, therefore in many laboratories and at bioindustrial enterprises for storage of viruses there are used moderately low temperatures ( $-20...-22^\circ\text{C}$ ). This stipulated the choice of the range of cryopreservation and storage regimens of viral material. Virus-containing liquid was packed into 1.8 and 2.0 cm<sup>3</sup> cryovials (Nunc, Denmark). Biological samples were cooled using a programmable freezer for biological objects (ZMP-1) with an electronic control unit (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine); cooling rate was 300–400 deg/min; in other cases the samples were cooled passively in the refrigerator chamber. Temperature conditions were monitored by thermogauge placed into the cooled object, or by low-temperature thermometer. The frozen in liquid nitrogen viruses were stored in Dewar vessels. The samples were either slowly thawed on air or in a water bath at 38...39°C for 1–2 min.

Titers of IBV infectious activity were determined by titration in 9–10-day-old chicken embryos, the embryonic virus infecting dose (EID<sub>50/ml</sub>) was calculated according to the standard procedure [2].

IBV hemagglutination titers were studied in hemagglutination reaction as reported by V.N. Syurin *et al.* [11]. The effect of moderately low temperatures and deep cooling on the IBV viral ultrastructure was investigated using electron microscopy. The samples were inactivated with 0.5% formaldehyde solution. The inactivation completeness was tested by means of three successive passages in 9-day-old chicken embryos. The virus samples were used for the electron microscopy studies if there was no infectious activity.

The neutralization reaction (NR) in chicken embryos and assessment of antigen specificity of the IBV virus after cryopreservation was performed with different virus dilutions and constant dose of a specific serum. Once infected with a mixture of serum and virus the 8–10 day-old chicken embryos were incubated at 37°C for 8 days with daily ovoscopy. Non-specific embryo death in the first 24 hrs was not taken into account. Neutralization was considered positive when no death of embryos were found as well as no changes characteristic for IBV resulting from neutralization of virus virulence by antibodies were observed. The results were evaluated by the neutralization index: if higher than 2 lg – the reaction was considered as positive; 1.5–2 lg – doubtful; 1 lg – negative.

Antigen specificity of cryopreserved viruses stored in the cryobank was found in serological neutralization reaction [12]. The dwarf embryos were studied according the method described by A.Ya Samujlenko *et al.* [9].



Постановку реакции нейтрализации (РН) в куриных эмбрионах и определение антигенной специфичности IBV после его криоконсервирования осуществляли с разными разведениями вируса и постоянной дозой специфической сыворотки. После заражения смесью сыворотки и вируса 8–10-суточных куриных эмбрионов их инкубировали при температуре 37°C в течение 8 суток, ежедневно овоскопируя. Гибель эмбрионов в первые 24 ч не учитывалась (неспецифическая гибель). Реакцию нейтрализации считали позитивной при отсутствии гибели эмбрионов и изменений, характерных для IBV, в результате нейтрализации вирулентности вируса антителами. Результаты оценивали по индексу нейтрализации: выше 2 lg – реакция положительна; 1,5–2 lg – сомнительная; 1 lg – негативная.

Антигенную специфичность криоконсервированных вирусов, которые хранились в криобанке, определяли в серологической реакции нейтрализации [12]. Изучение карликовости эмбрионов проводили по методу, описанному А.Я. Самуйленко и соавт. [9].

Эксперименты проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Изучение ультраструктуры вирусов проводили электронной микроскопией препаратов IBV, размороженных после хранения в различных температурных режимах, с помощью метода негативного контрастирования [13, 14].

Электронно-микроскопическим исследованиям подвергали образцы, которые хранили от 3-х суток до более 8 лет в условиях умеренно низкой (–20°C), низкой (–70°C) и температуры жидкого азота (–196°C). Использовали медные сетчатые платформы, которые покрывали формваровой пленкой. Адсорбция вирусных частиц, предварительно очищенных в градиенте плотности сахарозы [3], на пленках-подложках проводилась в течение 3–5 мин. Полученные вирусные препараты контрастировали с помощью фосфорновольфрамовой кислоты по общепринятой методике [13]. Исследования были проведены на электронном микроскопе «ПЭМ-125» с инструментальным увеличением 60–100 000 раз на базе Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.

При статистической обработке результатов исследований определяли средние значения и стандартные отклонения среднего. Значимость

The experiments were performed in accordance with the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 5<sup>th</sup> National Congress in Bioethics (Kiev, 2013) and consistent with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The investigations of virus ultrastructure were performed by electron microscopy of the IBV samples thawed after storage at different temperature regimens using the negative staining [15, 16].

Electron microscopy was performed in the samples which were stored from 3 days up to 8 years at moderately low (–20°C), low (–70°C) and liquid nitrogen temperatures (–196°C). The copper grid platforms covered with formvar film were used. Adsorption of virus particles, preliminary purified in sucrose density gradient [3] on the film substrate was carried out within 3–5 min. The resulted specimens were contrasted using phosphotungstic acid [15]. Studies were performed with PEM-125 electron microscope using the 60–100 thousand times magnification at the premises of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Performing statistical analysis of the research results we calculated mean and standard deviation. Significance of differences between samples was assessed according the Student-Fisher's test [13].

## Results and discussion

Electron microscopic study of the post-thaw IBV samples, stored from 3 days to 3.5 months at –20, –70 and –196°C demonstrated a large number of circular and elliptical virions with moderate polymorphism and the sizes of 90–160 nm. The central part of the virions from the mentioned samples was characterized by the concave presence. Ultrastructure of IBV viruses was presented with a two-layer lipoprotein membrane with clavate processes, *i. e.* peplomers of up to 20 nm, which formed a sort of the solar crown and nucleocapsid of 80 nm diameter (Fig. 1). Viral particles with a damaged lipoprotein membrane (shown with an arrow) made 5–7% of the total number of available virions.

Infectious virus activity after freezing of the samples stored not longer than 3.5 months was  $(6.31 \pm 0.02)$  EID<sub>50/ml</sub>. In all the cases of storage temperature and duration we identified such a feature of IBV infecting the chicken embryos as a slowed growth (dwarfism effect), regarded as a pathognomonic sign of IBV. Hemagglutination titers within these storage periods at –20°C did not differ from the baseline.

Infectious virus activity after thawing of the samples stored for 6 years at –20°C was reduced by three orders and made  $(3.63 \pm 0.03)$  EID<sub>50/ml</sub>. Haemagglutination titers in this case decreased from 1:64 in non-



различий между выборками оценивали по методу Стьюдента-Фишера [15].

### Результаты и обсуждение

Электронно-микроскопические исследования размороженных образцов IBV, которые хранились от 3-х суток до 3,5 месяцев при температурах  $-20$ ,  $-70$  и  $-196^{\circ}\text{C}$ , показали наличие большого количества округлых и эллиптических вирионов с умеренно выраженным полиморфизмом и размером  $90$ – $160$  нм. Центральная часть вирионов характеризовалась наличием впадины. Ультраструктура вирусов IBV была представлена двухслойной липопротеидной оболочкой с булавовидными отростками-пепломерами размером до  $20$  нм, которые образуют подобие солнечной короны, и нуклеокапсидом с диаметром  $80$  нм и более (рис. 1). Вирусные частицы с поврежденной липопротеидной оболочкой (показано стрелкой) составляли  $5$ – $7\%$  от всего количества имевшихся вирионов.

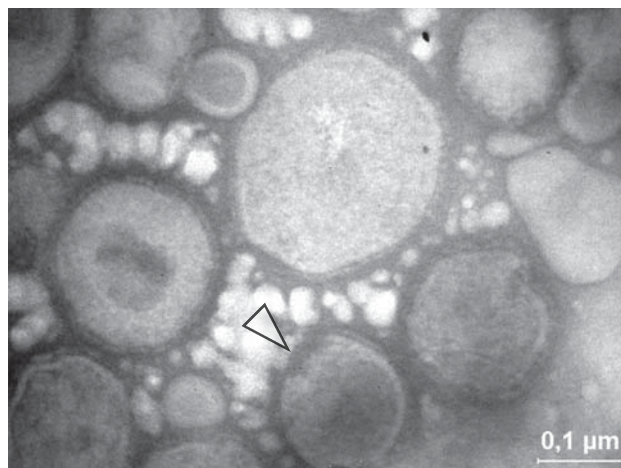
Инфекционная активность вируса после размораживания образцов, хранившихся не более 3,5 месяцев, составляла  $(6,31 \pm 0,02)$  ЭИД<sub>50/мл</sub>. При этом во всех случаях и исследованных сроках хранения был выявлен такой характерный признак заражения куриных эмбрионов IBV, как замедление их роста («эффект карликовости»), который является патогномичным признаком инфекционного бронхита. Титры гемагглютинации в эти сроки хранения при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  не изменялись по сравнению с исходными.

Инфекционная активность вируса после размораживания образцов, хранившихся в течение 6 лет при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , снизилась на три порядка и составляла  $(3,63 \pm 0,03)$  ЭИД<sub>50/мл</sub>. Титры гемагглютинации в этом случае снизились с  $1:64$  у незамороженных образцов до полной потери гемагглютинирующих свойств вирусом в процессе хранения.

Инфекционная активность вируса после размораживания образцов, хранившихся в течение 8 лет при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , снизилась на  $5$  lg по сравнению с исходной, при этом вирус полностью утратил гемагглютинирующие свойства.

Анализ электронограмм вирусов, которые хранились на протяжении 6 лет при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , показал наличие полиморфных вирионов с хорошо представленной двухслойной липопротеидной оболочкой, но гликопротеидные отростки, которые формируют подобие солнечной короны, практически отсутствовали (рис. 2). Встречались только единичные вирионы с сохранившейся «короной» из гликопротеинов.

Следует отметить, что также увеличилось число (около  $40\%$  от общего количества вирионов) позитив-



**Рис. 1.** Ультраструктура вируса IBV из образцов, хранившихся в течение 3-х месяцев при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  (стрелкой показано нарушение целостности липопротеидной оболочки).

**Fig. 1.** Ultrastructure of IBV virus samples stored for 3 months at  $-20^{\circ}\text{C}$  (arrow points to damaged lipoprotein envelope).

frozen samples down to complete loss of hemagglutinating properties manifested by the virus following storage.

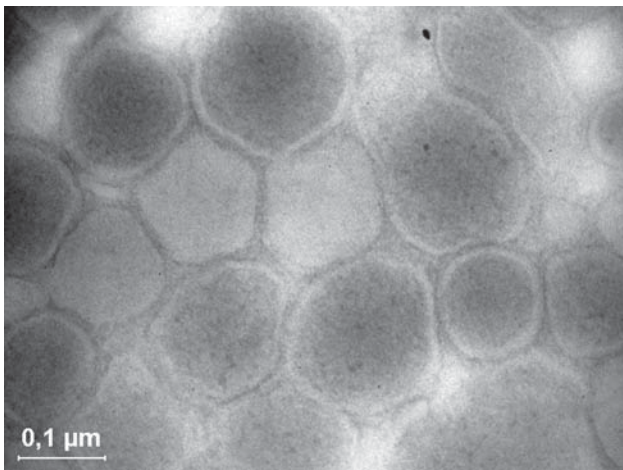
Infectious virus activity after thawing of the samples stored for 8 years at  $-20^{\circ}\text{C}$ , was reduced by  $5$  lg from the baseline, herewith the virus lost the haemagglutinating properties.

The analysis of electronograms of the viruses, stored for 6 years at  $-20^{\circ}\text{C}$ , showed the presence of polymorphic virions with a distinct bilayer lipoprotein envelope, but the glycoprotein processes, forming somewhat similar to the solar corona were almost absent (Fig. 2). There were only a few virions with the preserved crown of glycoproteins.

It should be noted that the number (about  $40\%$  of the total number of virions) of positively stained viral nucleocapsids increased after long term storage (within 6 years) of the viral suspension under the moderately low temperatures ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). At the same time the positively stained lipoprotein envelopes of virions became negatively stained following a long-term storage. The electron micrographs show that the virions change their shape during long-term storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  (Fig. 2–4).

The performed studies have also shown that the electric charge of viral particles, providing adsorption of a certain amount of virions on a cell membrane, changes during their storage. It is known that the difference of potentials between positively charged ice and negatively charged liquid fraction appears at the phase transition during freezing of the water or suspensions with a biological material [4, 6]. Positive charge of ice is due to the inclusion of ions ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) in its crystals and negative charge of unfrozen fraction is





**Рис. 2.** Ультраструктура IBV из образцов, хранившихся в течение 6 лет при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Fig. 2.** Ultrastructure of the IBV from the samples stored for 6 years at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

но окрашенных нуклеокапсидов вирусных частиц после длительного хранения (в течение 6 лет) вирусных суспензий в условиях умеренно низкой температуры ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). В то же время позитивное окрашивание липопротеидных оболочек вирионов в процессе долгосрочного хранения изменялось на негативное. Из приведенных электронных микрофотографий видно, что у вирионов в процессе долгосрочного хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$  происходят изменения формы (рис. 2–4).

Проведенные исследования также показали, что электрический заряд вирусных частиц за счет которого происходит адсорбция определенного количества вирионов на клеточной мембране, изменяется в процессе их длительного хранения. Известно, что разность потенциалов между положительно заряженным льдом и отрицательно заряженной жидкой фракцией возникает при фазовом переходе, замораживании воды или суспензий с биологическим материалом [4, 6]. Положительный заряд льда обусловлен включением в его кристаллы ионов ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ), а отрицательный заряд незамерзшей фракции – наличием избытка ионов гидроксильной группы ( $\text{OH}^-$ ). Вирионы в процессе замораживания обязательно попадают в зону фазового перехода «вода-лед», обладая суммарным электрическим зарядом определенной величины [6], при этом они подвергаются воздействию внешнего электрического поля.

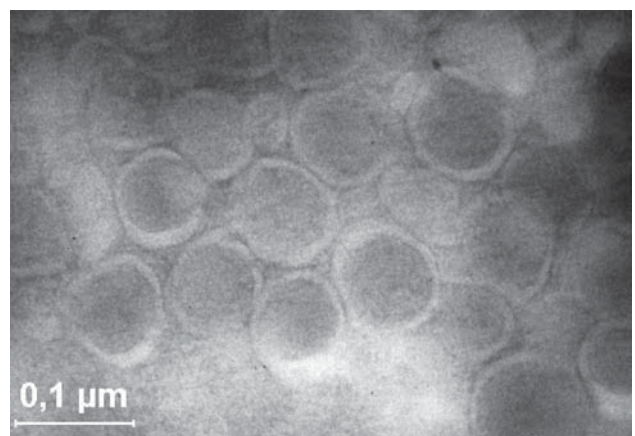
Можно предположить, что в процессе длительного хранения IBV при  $-20^{\circ}\text{C}$  происходит дестабилизация структуры вирионов за счет не только изменения их формы, но и внутримолекулярной подвижности структурных компонентов молекул белка вириона. Исследования В.И. Лугового [5]

stipulated with the excessive content of hydroxyl ions ( $\text{OH}^-$ ). During freezing the virions possessing a total electric charge of a certain value [6] occur for sure to the water-ice phase transition zone, whereat they are exposed to an external electric field effect.

It can be assumed that during long-term storage of IBV at  $-20^{\circ}\text{C}$  the structure of virions could be destabilized because of the conformational changes associated not only with an alteration in their shape, but also with intramolecular mobility of structural components of the virion protein molecules. The researches of V.I. Lugovoy [5] on the mechanisms of freezing damaging effect on proteins, in particular enzymes, have shown that one of the main causes of the disordered structural and functional properties of enzyme proteins are high concentrations of inorganic salts, appearing during water crystallization in the solution, having lyotropic properties as well as provide the pH shifts during the water freezing-out. The author believed that the structural basis of cryostability or cryolability in enzyme proteins was stipulated by an unequal degree of conformational mobility and rigidity of macromolecules, which, in turn, was caused (in accordance to the principle of thermodynamic free energy minimum) by different features of the amino acid composition of the protein molecule polypeptide chain.

The absence of peplomers on the electronograms of IBV stored for 6 years at  $-20^{\circ}\text{C}$ , explains the total loss of hemagglutinating properties.

The change in electric charge of viral particles providing the adsorption of a certain amount of virions on a cell membrane may be one of the causes of declining the IBV infectious activity during storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Рис. 3.** Ультраструктура IBV из образцов, хранившихся в течение 8 лет при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  (большинство вирионов имеют позитивно окрашенный нуклеокапсид и негативно окрашенную оболочку).

**Fig. 3.** Ultrastructure of IBV of samples stored for 8 years at  $-20^{\circ}\text{C}$  (most virions have positively stained nucleocapsid and negatively stained envelope).



по изучению механизмов повреждающего действия замораживания на белки, в частности – ферменты, показали, что одной из основных причин нарушения структурно-функциональных свойств белков-ферментов являются высокие концентрации неорганических солей, которые возникают при кристаллизации воды в растворе за счет их литропных свойств, а также сдвигов pH при вымораживании воды. Автор полагает, что структурную основу криостабильности или криолабильности белков-ферментов составляет неодинаковая степень конформационной подвижности и жесткости их макромолекул, которая, в свою очередь, обусловлена (в соответствии с термодинамическим правилом минимума свободной энергии) различными особенностями аминокислотного состава полипептидной цепи белковой молекулы.

Отсутствие пепломеров на электронограммах IBV, хранившихся в течение 6 лет при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , объясняет причину полной потери гемоглиутинирующих свойств.

Изменение электрического заряда вирусных частиц, за счет которого происходит адсорбция определенного количества вирионов на клеточной мембране, возможно, является одной из причин снижения инфекционной активности IBV в процессе хранения при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Электронно-микроскопические исследования образцов вируса IBV (штамм Массачуссетс АМ), которые хранились на протяжении 8 лет при  $-20^{\circ}\text{C}$ , показали выраженное увеличение количества вирионов, имеющих положительно окрашенный капсид (более 50% от общего количества вирионов) и отрицательно окрашенную липопротеидную оболочку (см. рис. 3).

Сохранность ультраструктуры вирионов при этом в образце была неодинакова, что позволяет предположить наличие гетерогенных популяций вирусов с различной криоустойчивостью даже в пределах одного штамма, поскольку наряду с вирусными частицами, утратившими гликопротеидные отростки, встречались популяции вируса с сохранившимися ультраструктурой и электрическим зарядом. Об этом свидетельствует как позитивно контрастированная двухслойная мембрана липопротеидной оболочки отдельных вирионов, так и негативно контрастированный нуклеокапсид (см. рис. 4). При этом количество вирусных частиц с нарушенной целостностью липопротеидной оболочки в исследованных полях зрения образцов, хранившихся более 8 лет, не превышало 10%.

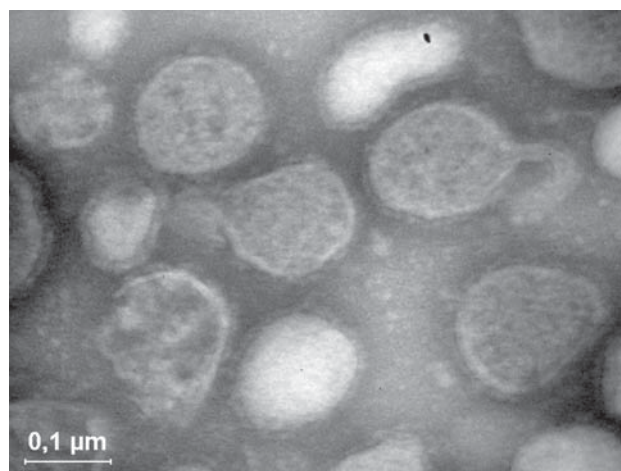
Следует отметить, что с увеличением срока хранения в условиях умеренно низкой температуры усиливается неоднородность морфологии вирионов:

Electron microscopic examination of the samples of the Massachusetts AM IBV, which were stored for 8 years at  $-20^{\circ}\text{C}$ , has shown a pronounced increase in the number of virions with positively stained capsid (more than 50% of the total number of virions) and negatively stained lipoprotein envelope (Fig. 3).

The extent of ultrastructure preservation in virions through the sample was not equal, suggesting the presence of heterogeneous populations of viruses with various cryoresistance even within a single strain, because along with the viral particles that have lost the glycoprotein processes, there have been found the virus populations with preserved ultrastructure and electric charge. This was evidenced both by a positively stained bilayer membrane of the lipoprotein envelope of individual virions, and negatively stained nucleocapsid (Fig. 4). Herewith the number of viral particles with a disordered integrity of lipoprotein envelope in the studied vision fields of the samples stored for longer than 8 years, did not exceed 10%.

It should be noted that increasing the period of storage under moderately low temperatures was accompanied with the rising in heterogeneity of virion morphology: there were found the virions of not only round, oval, but of irregular shape as well (Fig. 4), the majority of virions were positively stained.

The ultrastructure of IBV, long-term-stored at low temperatures ( $-70$  and  $-196^{\circ}\text{C}$ ) was more intact (Fig. 5) than after storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  and was close to the ultrastructure of the virus, which was shortly stored (3 months) at a temperature of domestic refrigerator (see Fig. 1). Hypothetically the storage of biological objects at liquid nitrogen temperatures allows the indefinitely long maintaining of their integrity, but in practice it turned out that the found at moderately low



**Рис. 4.** Разнообразие ультраструктуры IBV из образцов, хранившихся в течение 8 лет при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Fig. 4.** Diverse ultrastructure of IBV in samples stored for 8 years at  $-20^{\circ}\text{C}$ .



встречаются вирионы не только округлой, овальной, но и неправильной формы (см. рис. 4), большинство вирионов позитивно окрашены.

Ультраструктура вирусов IBV, длительно хранившихся при низких ( $-70$  и  $-196^{\circ}\text{C}$ ) температурах более полноценна (рис. 5), чем после хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$  и близка к ультраструктуре вируса, хранившегося в течение непродолжительного времени (3 месяца) при температуре бытового холодильника (см. рис. 1). Теоретически хранение биологических объектов при температурах жидкого азота позволяет поддерживать их сохранность неограниченное время, однако на практике оказалось, что сохраняются выявленные при умеренно низких температурах тенденции: с увеличением срока хранения вирусов постепенно снижается их инфекционная активность и гемагглютинирующие свойства, но в гораздо меньшей степени, чем после хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

При этом инфекционная активность снижалась не более чем на 2 lg по сравнению с исходной, и вирус не терял гемагглютинирующие свойства. Более 50% вирионов даже после 6- и 8-летнего срока хранения при температуре  $-70$  и  $-196^{\circ}\text{C}$  сохраняли негативно окрашенный нуклеокапсид и пепломеры «короны».

Все это свидетельствует о том, что чем ниже температура хранения криоконсервированных вирусов, тем полнее сохраняется их ультраструктура и биологические свойства. Электронно-микроскопический метод исследований позволил визуально оценить роль нарушений структурной целостности вирионов, в частности вирусных оболочек и нуклеокапсида, в криоповреждениях вирусов при их криоконсервировании и низкотемпературном хранении на примере IBV.

## Выводы

Проведенные исследования выявили на электронограммах ультраструктурные изменения IBV при длительном хранении в условиях умеренно низкой температуры ( $-20^{\circ}\text{C}$ ): нарушение целостности липопротеидной оболочки вирионов; потерю гликопротеидной «короны» у большинства вирионов; конформационную дестабилизацию структурных компонентов вирусных белков оболочки и нуклеокапсида.

С увеличением срока хранения до 8 лет при  $-20^{\circ}\text{C}$  увеличивается количество позитивно окрашенных вирионов и вирусных частиц с повреждениями пепломеров или полным их отсутствием. Изменения ультраструктуры образцов вируса сопровождались снижением его инфекционной активности и потерей гемагглютинирующей активности при длительном хранении образцов IBV в условиях умеренно низкой температуры  $-20^{\circ}\text{C}$ .

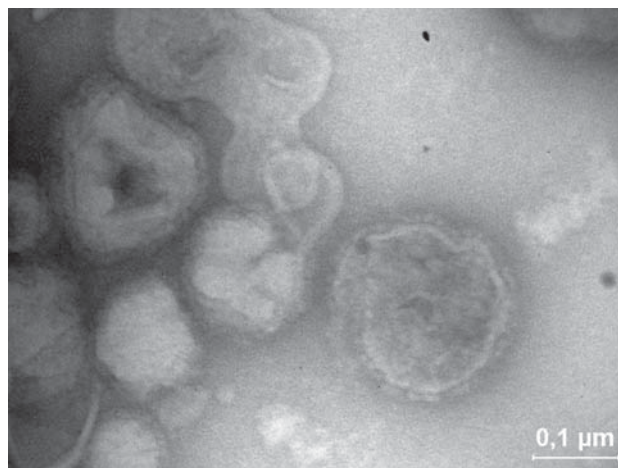


Рис. 5. Ультраструктура IBV из образцов, хранившихся в течение 6 лет при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Fig. 4. Ultrastructure of IBV virus from samples stored for 6 years at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

temperatures tendencies were the same: with a rise in the virus storage duration their infectivity and haemagglutinating properties gradually reduced, but in much lesser extent than after storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Herewith the infectious activity fell more than by 2 lg if compared to the initial, and the virus did not lose haemagglutinating properties. More than 50% of virions even after the 6- and 8-year storage at  $-70$  and  $-196^{\circ}\text{C}$  retained the negatively stained nucleocapsid and 'crown' peplomers.

All this testifies to the fact that the lower the storage temperature of cryopreserved viruses is, the more fully their ultrastructure and biological properties are retained. Electron microscopy studies allowed a visual assessment of the contribution of disordered structural integrity of the virions, particularly the viral membranes and nucleocapsid, in the cryoinjuries of viruses during their cryopreservation and low temperature storage as exemplified by IBV.

## Conclusions

The conducted study allowed to reveal in electronograms the ultrastructural changes in IBV during long term storage at moderately low temperature ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), in particular the disordered integrity of the lipoprotein envelope of virions; loss of glycoprotein 'crown' in the majority of virions; conformational destabilization of the structural components of the envelope viral proteins and the nucleocapsid.

With a rise in the storage term at  $-20^{\circ}\text{C}$  of up to 8 years there was an increase in the number of positively stained virions and viral particles with damaged or absent peplomers. The changes in ultrastructure of the virus samples were accompanied by a decrease in its infectious activity and loss of hemagglutinating



При хранении образцов IBV в условиях  $-70$  и  $-196^{\circ}\text{C}$  вирионы в основном сохраняют негативное окрашивание и пепломеры «короны» в течение исследованных сроков хранения. При долгосрочном хранении вируса в условиях низкотемпературного холодильника ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) и жидкого азота ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) нарушение целостности липопротеидной оболочки и конформационной структуры молекул белка наблюдалось не более чем у 10% от всех вирионов.

one during long-term storage of IBV samples at moderately low temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$ .

When storing the IBV samples at  $-70$  and  $-196^{\circ}\text{C}$  the virions generally remain negatively stained, keep 'crown' peplomers for the studied storage duration. During long-term storage of the virus under conditions of low temperature refrigerator ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) and liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) the compromised lipoprotein envelope and conformational structure of the protein molecules was observed not more than in 10% of the virions.

## Литература

1. Бакулин В.А., Севастьянов Г.А., Коровин Р.Н. и др. Атлас ультраструктурной патологии вирусных болезней птиц. СПб: НИИХ СПбГУ, 1999. – 48 с.
2. Борисов А.В., Гусев А.А., Смоленский В.И. и др. Оптимальные условия культивирования вакцинных штаммов вируса инфекционного бронхита кур // Вирусные болезни с.-х. животных: Тез. докл. Всерос. науч.-практ. конференции. – Владимир, 1995. – С. 144.
3. Бочков Ю.А., Дрыгин В.В., Хлыбова Т.В. Очистка и концентрирование вируса инфекционного бронхита кур // Проблемы инфекционной патологии с.-х. животных: Тез. докл. конференции. – Владимир, 1997. – С. 152.
4. Качурин Л.Г., Бекряев В.И., Псаломщиков В.Ф. Экспериментальное исследование электрокинетического явления, возникающего при кристаллизации слабых растворов // Докл. АН СССР. – 1967. – Т. 174, №5. – С. 1122–1130.
5. Луговой В.И. Механизмы повреждающего действия замораживания на растворимые и мембраносвязанные ферменты. – Харьков, 1985. – 360 с.
6. Опарин Ю.Г. Повреждение и защита биоматериалов при замораживании и лиофилизации // Биотехнология. – 1996. – №7. – С. 3–13.
7. Пономарев А.П. Структурно-функциональные аспекты строения изометрических вирусов животных // Вестник РАСХН. – 2001. – №4. – С. 10–13.
8. Пономарев А.П., Мищенко В.А. Электронная микроскопия вирусов животного и некоторых условно-патогенных микроорганизмов. – Владимир: Фолиант, 2005. – 160 с.
9. Самуйленко А.Я., Непоклонов Е.А., Соловьев Б.В. Инфекционная патология животных. В 2 т. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – Т. 1. – 1911 с.
10. Стегний М.Ю. Вплив кріоконсервування на біологічні властивості, особливості репродукції і молекулярно-генетичну структуру штаму А/курка/Сиваш/02/05(H5N1) високопатогенного грипу птахів. В кн.: Високопатогенний грип птиці / Під ред. проф. Б.Т. Стегнія. – Харків. – 2006. – 142 с.
11. Стегний Б.Т., Музыка Д.В., Стегний А.Б. та ін. Антигенні властивості вакцини для профілактики ньюкаслської хвороби, інфекційного бронхіту курей та синдрому зниження несучості // Вет. медицина. – 2014. – Вип. 99. – С. 105–107.
12. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В. Вирусные болезни животных. – М., 1998. – 928 с.
13. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Пер. с англ. И.В. Викторова. – М.: Мир, 1975. – 336 с.
14. Turcu D., Barboi Gh., Paltineanu D. et al. Use of negative (contrast) staining electron microscopy for animal viruses fast identification // Stud. Res. Vet. Med. – 1994. – №2. – P. 77–82.
15. Van Emden H. Statistics for terrified biologists. – Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd., 2009. – 343 p.
16. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. et al. Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. – San Diego: Academic Press, 2000. – 1167 p.

## References

1. Bakulin V.A., Sevastyanov G.A., Korovin R.N. et al. Atlas of ultrastructural pathology of viral disease in birds. St. Petersburg: St. Petersburg State University R&D Institute of Chemistry, 1999.
2. Borisov A.V., Gusev A.A., Smolensky V.I. et al. Optimal cultural conditions of vaccine strains of infectious bronchitis of chickens. Viral diseases of agricultural animals: Proceedings of the All-Russian Scientific and Practical Conference. Vladimir, 1995: p. 144.
3. Bochkov Yu.A., Drygin V.V., Khlybova T.V. Purification and concentration of infectious bronchitis virus of chickens // Problems of infectious diseases of agricultural animals: Proceedings of the All-Russian Scientific and Practical Conference. Vladimir, 1997: p. 1152.
4. Kachurin L.G., Bekryaev V.I., Psalomschikov V.A. Experimental study of electrokinetic phenomenon occurring during crystallization of weak solutions. Doklady of the USSR Academy of Sciences 1967; 174 (5): 1122–1130.
5. Lugovoy V.I. Mechanisms of freezing damaging effect on soluble and membrane-bound enzymes. Kharkov, 1985.
6. Oparin Yu.G. Damage and protection of biomaterials during freezing and lyophilisation. Biotechnologiya 1996; (7): 3–13.
7. Ponomarev A.P. Structural and functional aspects of structure of isometric animal viruses. Vestnik RASKhN 2001; (4): 10–13.
8. Ponomarev A.P., Mishchenko V.A. Electron microscopy of viruses in animals and certain opportunistic microorganisms. Vladimir: Folio, 2005.
9. Syurin V.N., Samujlenko A.Ya., Solovyov B.V. Viral diseases of animals. Moscow, 1998.
10. Samujlenko A.Ya., Nepoklonov E.A., Solovyov B.V. Infectious pathology of animals. Moscow: Akademkniga, 2006. Vol. 1.
11. Stegnyy M.Yu. Effect of cryopreservation on biological properties, peculiarities of reproduction and molecular genetic structure of the strain A /chicken / Sivash / 02/05 (H5N1) of highly pathogenetic avian grippе. In : Stegnyy B.T., editor. Highly pathogenetic avian grippе. Kharkiv, 2006.
12. Stegnyy B.T., Muzyka D.V., Stegnyy A.B. et al. Antigenic properties of vaccine for prevention of New Castle disease, infectious bronchitis of chickens and syndrome of egg production drop. Vet Medytsyna 2014; (99): 105–107.
13. Turcu D., Barboi Gh., Paltineanu D. et al. Use of negative (contrast) staining electron microscopy for animal viruses fast identification. Stud Res Vet Med 1994; (2): 77–82.
14. Van Emden H. Statistics for terrified biologists. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd., 2009.
15. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. et al., editors. Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000.
16. Weakley B. A beginner's handbook in biological electron microscopy. Edinburgh, 1972.

