

**SIVI AZOT İLE YAPILAN KRYOPRESERVASYON TEKNİKLERİNDE
MİKROBİYAL KONTAMİNASYON RİSKLERİ VE ÇÖZÜM ÖNERİLERİ
(DERLEME)**

**(Microbial Contamination Risks And Solution Recommendations In The
Cryopreservation Techniques With Liquid Nitrogen)
(A Review)**

İlker YAVAŞ¹

Zafer CANTEKİN²

Tuğba KORKMAZ YAVAŞ³

¹:Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Hatay

²:Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Hatay,

³:Hatay Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Hatay

Geliş Tarihi: 19.07.2012

Kabul Tarihi: 05.08.2013

ÖZET

Spermanın ve embriyonun dondurularak saklanabilmesi, genetik materyalin korunması ve kolaylıkla nakledilmesine olanak vermiştir. Böylelikle yüksek kaliteli genetik materyal dünyanın her yerine taşınabilmektedir. Bununla birlikte, sıvı azot kullanılarak yapılan saklama teknikleri kontaminasyon gibi bazı riskler de taşımaktadır. Bu derleme de, sıvı azot kullanılarak yapılan kryopreservasyon işlemlerinde mikrobiyal kontaminasyon risklerine değinilmekte ve bazı çözüm önerileri getirilmektedir.

Anahtar sözcükler: Kryopreservasyon, Mikrobiyal Kontaminasyon, Sıvı Azot, Genetik Materyal.

SUMMARY

Freezing and storage of semen and embryos provided protection and easily transportation of genetic material. Thus, high-quality genetic material can be transported anywhere in the world. However, liquid nitrogen storage techniques have some risks such as contamination. In this review, microbial contamination risks in the cryopreservation techniques with liquid nitrogen were mentioned and suggested some solutions.

Keywords: Cryopreservation, Microbial Contamination, Liquid Nitrogen, Genetic Material.

GİRİŞ

İlk olarak 1949 yılında gliserolün soğuşa karşı koruyucu etkilerinin keşfedilmesi (11) ile birlikte, gamet hücreleri gibi canlı hücrelerin çok düşük sıcaklıklarda dondurma esnasında oluşan kristalleşmeden etkilenmeden uzun süre canlılıklarını koruyabilecekleri ortaya konmuştur. Sonraki yıllarda sperma sulandırma

ve dondurma tekniklerinin de gelişimiyle birlikte bu alanda dünya çapında bir endüstri oluşmuştur. Dünya genelinde, 2002 yılında 264 milyon doz boğa sperması ve 270.500 embriyo üretilmiş, üretilen spermaların %95 i dondurularak saklanmış ve bu spermalardan 20 milyonu uluslararası düzeyde nakledilmiştir (19).

Kryopreservasyon veteriner hekimlikte ve klinik reproduktif biyoteknolojide, reproduktif materyalin dondurularak saklanmasını sağlayarak anahtar bir rol oynamaktadır. Örneğin canlı hücreler uygun sulandırıcı ve teknikler kullanılarak sıvı azot içerisinde -196°C de uzun süreli olarak saklanabilmektedir. Bu teknik ayrıca zaman ve mesafe ile ilgili birçok tehdidi ortadan kaldırarak, reproduktif materyalin ulusal ve uluslararası nakline olanak vermektedir (4).

Canlı hücre dondurma ve saklanmasında kullanılan sıvı azot, filtrasyon tekniği kullanılarak üretilmektedir. Mikroorganizma barındırmayacak şekilde hazırlanmasına rağmen sıvı azot, saklama ve dağıtım esnasında hava ile temas etmesi sonucunda kontamine olabilmektedir (8). Sıvı azot tanklarının kontaminasyon mekanizmasında ise havadaki su buharı, açık sıvı azot tankına temas edince soğumakta ve küçük buz kristalleri oluşmaktadır. Bu kristaller yüksek elektrostatik çekim güçleri nedeniyle havadan gelen mikroorganizmaları azot tankının içine çekerek, tank içindeki azot ve payet yüzeylerinin kontamine olmasına neden olmaktadır. Bu kontaminasyon, azot tankı boşaltılıp temizlenene kadar mikrobiyolojik tehlike oluşturmaktadır (9). Böylelikle, azot tankı içinde taşınan materyal de kontamine olabilmekte ve mikroorganizmaları taşıyabilmektedir (9, 1). Özellikle canlı materyalin sıvı azot içerisinde beslenmesini ve uzun süreli yaşayabilmesini sağlamak amacıyla kullanılan kryopreservasyon medyumları yüksek düzeyde besleyici özelliğe sahiptirler.

Ayrıca pH ve elektrolit düzeyleri canlı hücrelerin yaşamı için optimum şekilde ayarlanmıştır. Onların bu özellikleri kontaminasyon sonucunda bulaşan mantar sporları, bakteri ve virüsler için de uygun bir ortam oluşturabilmektedir (9).

MİKROORGANİZMALARIN DÜŞÜK SICAKLIKTAKİ CANLI KALMALARINI

Mikroorganizmalar da gamet hücrelerine benzer şekilde kryopreservatif madde içeren besi yeri ya da vasat içerisinde dondurularak uzun süreli olarak saklanabilmekte ve gerektiğinde uygun ısıda tekrar aktive edilebilmektedir. Mikroorganizmaların bu şekilde sıvı azot içinde (-196°C) uzun süre kalabilmesi sıvı azotta oluşabilecek bir kontaminasyonun önemini artırmaktadır (16). Embriyo kültür medyumlarındaki ve sperma sulandırıcıları içerisindeki maddeler (süt, serum albümin, sukroz, sorbitol ve diğer şekerler vs.) mikroorganizmalar için de uygun bir besin kaynağı ve yaşam ortamı olarak görev yapabilmektedir (3).

Kryoprotektan olarak kullanılan maddelerden, DMSO (Dimetil sülfoksit, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$), metanol ve etilen glikol'ün mikroorganizmaları gliserol ve polietilen glikole göre soğuktan daha iyi koruyabildikleri bildirilmiştir (7). Örnek olarak, %5 ve daha düşük oranlardaki DMSO'nun, zarlı virüsleri soğuk hasarına karşı koruduğu gösterilmiştir. Zarsız virüslerin ise dondurma ve çözündürme işlemleri sırasında kryoprotektan madde yokluğunda bile inaktive olmadıkları belirlenmiştir (20). Bir çalışmada, bazı infeksiyöz etkenler (bovine rhinotraheitis virus

(IBRV), BVDV, bovine parainfluenza virus type 3 (PI3) ve mavi dil virüsü) embriyo toplama vasatına ekilmiş, sonra +4°C, -20°C ve -70°C de saklanan embriyolarda etkenlerin bulunup bulunmadığına bakılmıştır. Araştırılan tüm virüslere ait titreler +4°C de 6 gün sabit kalmıştır, -20°C de 3 aya kadar saklanan bazı virüslerin titrelerinde azalma gözlemlenmiştir. -70°C de ise tüm virüslerin iyi bir şekilde muhafaza edildiği ve titrelerini kaybetmedikleri belirtilmiştir (22). Bu mikroorganizmaların sulandırıcı vasatlar ve tank içerisinde canlı kalması, hem embriyo transferi ve suni tohumlama alıcıları için hem de uluslararası taşıma sırasında test ve saklama yerleri için de hastalık bulaşma riski taşımaktadır. Hayvan embriyo ve spermalarının hastalık riski taşımadığından emin olmak için, vericiler kadar, kullanılan medyumların, taze ve donmuş-çözülmüş sperma ve embriyoların da mikrobiyal analizlerinin yapılması gereklidir (3).

Bir çok mikroorganizma çok yüksek DMSO konsantrasyonlarına dayanabilmekte, bunlarda herhangi bir toksisite oluşmamaktadır, hatta bazı etkenlerin (*Acinetobacter spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.*, ve *Streptomyces spp.*) %2 ile %45 arası oranlarda DMSO içeren vasatlarda canlı kaldıkları ve çoğalabildikleri bildirilmiştir (7). Bununla birlikte, kryopreservasyonun boğa spermasındaki genel bakteri sayısını azalttığı belirlenmiştir (21). Örneğin antibiyotiksiz kültür medyumunda bulunan *Brucella spp.* süspansiyonunda bulunan etken sayısının basit dondurma-çözdürme prosedürleri ile %64

oranında azaldığı gösterilmiştir (18). Mantarların ise bakterilere göre soğuğa karşı çok daha hassas oldukları ve kryoprotektan maddelerin yüksek konsantrasyonlarına da daha duyarlı oldukları belirlenmiştir. Örneğin, insan spermasına yapılan çalışmada, spermaya bulaştırılan mantar etkenleri dondurma-çözdürme işlemi sırasında %90 oranında azalmıştır (6). Bununla birlikte, sperma ya da zona pellucida da bulunan çok düşük titredeki patojen mikroorganizmalar hastalık oluşturabilmektedir, ayrıca, dondurulmuş sperma ve embriyolarla alıcıların uterusuna bırakılan etkenlerin buradaki yaşabilme yetenekleri hakkında çok az bilgi mevcuttur (3).

SIVI AZOT VASITASIYLA PATOJENLERİN TAŞINIMI VE ÇAPRAZ KONTAMİNASYON

Çeşitli yayınlarda, direk sıvı azot teması ile yapılan dermatolojik uygulamalarda hepatitis B virus (HBV), herpes simplex, adenovirus ve papillomavirus gibi etkenlerin yayılma riski ortaya konulmuştur (5, 6, 13). Sıvı azotta saklanan kemik iliğinin nakli sırasında Hepatit B hastalığının taşındığı belirlenmiş ve bunun sonrasında dondurulmuş hücrelerin güvenliğine daha çok önem verilmesi gerektiği vurgulanmıştır (17).

Piasecka (10), infekte sperma payetlerinden, steril payetlere bakteri taşınımını deneysel olarak ilk kez ortaya koymuştur. Bu çalışmada sıvı azot tankına kontamine payetler ile birlikte yerleştirilen steril örneklerin %95 inin, 2 haftada *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*

etkenleri ile infekte olduğunu belirlemiştir. Farklı bir çalışmada ise bovine viral diarrhoea virus (BVDV), bovine herpesvirus-1 (BHV) ve bovine immunodeficiency virüs (BIV) gibi üç farklı viral etken kullanılmış ve bu etkenlerle kontamine edilen sıvı azotta 3-5 hafta kalan embriyolar çözülerek testten geçirilmiş, steril örneklerden %21.3 ünde BVDV ve BHV-1 virüsleri izole edilmiştir (1).

Bielanski ve ark. (1), yaptıkları çalışmada sıvı azot, sperma ve embriyo örneklerinde 32 farklı bakteriyel etken ve bir de mantar izole etmişlerdir. Aynı çalışmada azot tanklarından izole ettikleri çoğunlukla çevresel mikroorganizmalar olmalarının yanı sıra az bir kısmının fırsatçı patojenler olarak kabul edilen etkenler olduklarını bildirmişler, ancak tanklar ve spermadan izole edilen bu etkenlerin in vitro olarak fertilizasyon başarısını ve embriyonik gelişmeyi ciddi olarak baskıladığını tespit etmişlerdir.

Sıvı azotta saklanan embriyo ve spermalarda çapraz kontaminasyon riski bulunmaktadır, ama tam olarak ispatlanamamıştır. Bununla birlikte, yıllık olarak binlerce embriyo, milyonlarca sperma dondurulmakta ve transfer edilmektedir. Bu aşamadan sonra alıcıların büyük çoğunluğunun sağlık durumu hakkında yeterli bilgiye sahip bulunmadığımız için, ticari amaçla üretilen ve sıvı azotta saklanan sperma ve embriyolardaki çapraz kontaminasyon riski, yüksek titrelili etkenlerle yapılan deneysel çalışmalara göre göz ardı edilmiştir (12).

KRYOPRESERVASYON TEKNİKLERİNDE BAŞLICA KONTAMİNASYON KAYNAKLARI

1. Kontamine Sıvı Azot Tankları,
2. Sperma ve Embriyo toplanan hayvanların hasta olması,
3. Sperma sulandırıcılarının ya da embriyo kültür vasatlarının kontamine oluşu,
4. Embriyo ya da sperma içeren payetlerin iyi şekilde kapatılmaması,
5. Sperma ya da embriyo üretim işleminin yapıldığı ortamın, kullanılan malzemelerin ya da kişilerin kontamine olması,
6. Steril olmayan sıvı azot kullanımı,
7. Sıvı azot tanklarının bulunduğu ortam ya da laboratuvarın havasının filtre edilmemesi,
8. Embriyo nakli ya da suni tohumlama gerçekleştiren kişilerin kontamine olması,
9. Açık sistem azot tanklarının kullanılması (1, 2, 3, 4).

SONUÇ VE ÇÖZÜM ÖNERİLERİ

Sperma ve embriyo kryopreservasyonunda dondurma metodu seçilirken sadece çözdürme sonrasında hücrelerin canlılığı değil, aynı zamanda suni tohumlama ya da embriyo transferi ile kullanılarak aktarılan gametlerin hastalık taşıma risklerinin en alt seviyede olmasına da özen gösterilmelidir (3).

Kryopreservasyon sistemlerinde numunelerin azotla direkt olarak temasını önlemek için geleneksel tip azot saklama tankları yerine kuru sistem tanklar ya da elektrikle çalışan ultra düşük derin dondurucular kullanılabilir (Şekil 1, Şekil 2a,b, Şekil 3). Kuru tip sistemlerde azot örneklerle temas etmemektedir, cihazın içinde ayrı bir kısımda azot depolanmakta, böylece kontaminasyon riski büyük oranda azalmaktadır. Ayrıca, elektrikle çalışan ultra düşük derin dondurucular da özellikle laboratuvar ortamında sperma saklanması için alternatif olabilmektedir (23). Yapılan çalışmada, sıvı azot ve -152°C lik ultra derin dondurucularda yapılan kryopreservasyon işlemleri sonrası sperma muayenelerinde istatistiksel farka rastlanmamış ve ultra derin dondurucuların sıvı azot ile dondurma ve saklama sistemlerine alternatif olabileceği belirtilmiştir (23).

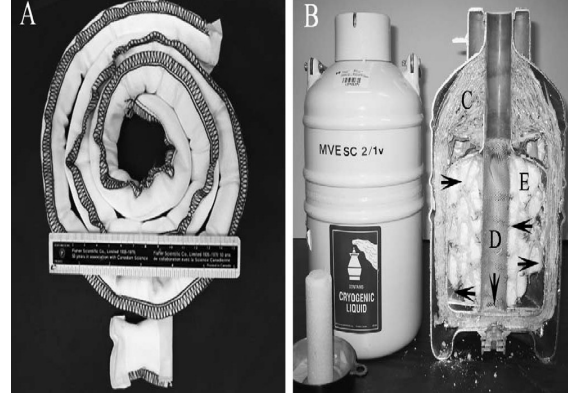
Geleneksel tip açık azot tankları belli aralıklarla boşaltılıp, temizlenmeli ve etilen oksit gibi maddelerle (14) steril hale getirilmelidir.

Azot tanklarına eklenen sıvı azot steril olmalıdır. Sıvı azot UV ya da filtrasyon yöntemleriyle steril hale getirilebilmektedir (15).

Sperma veya embriyoları alınan hayvanlar hastalıklardan arı olmalı, rutin sağlık kontrolleri ve mikrobiyolojik analizleri düzenli yapılmalıdır.

Çevresel kontaminasyonların önlenmesi için, sperma ve embriyo kryopreservasyonunun

yapıldığı ortamlarda uygun filtreli havalandırma sistemleri bulunmalı ayrıca sperma ve embriyo sulandırıcı ve vasatlarında kullanılan maddeler steril olmalıdır.



Şekil 1. Kuru Sistem Azot Tankı

- (A) Kollaidal slika içeren azot emici membran
(B) Kuru sistem azot saklama tankı (MVE SC2/V1)
(C) İzolasyon
(D) Depolama çemberi ve metal ayırıcı
(E) Azot emici (Oklar) Örneklerin toplandığı yerleri belirtmektedir (2).



Şekil 2a. Isotermal Kuru Sistem Saklama Tankı İç Görüntüsü (CBS V serisi)



Şekil 2b. Isotermal Kuru Sistem Saklama Tankı Dış Görüntüsü (CBS V serisi)



Şekil 3. -152°C Derin Dondurucu (Sanyo, MDF-1156)

KAYNAKLAR

- Bielanski A, Bergeron H, Lau PCK, Devenish J** (2003): Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 46(2): 46-52.
- Bielanski, A** (2005): Experimental microbial contamination and disinfection of dry (vapour) shipper dewars designed for short-term storage and transportation of cryopreserved germplasm and other biological specimens. *Theriogenology*, 63: 1946-1957.
- Bielanski, A** (2012): A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices *Theriogenology*, 77: 467-482
- Grout BWW, Morris GJ** (2009): Contaminated liquid nitrogen vapour as a risk factor in pathogen transfer. *Theriogenology*, 71: 1079-1082.
- Jones SK, Darville JM** (1989): Transmission of virus particles by cryotherapy and multi-use caustic pencils: a problem to dermatologists. *Br. J. Dermatol*, 121: 481-6 (Abstrakt)
- Glander HJ, Rytter M, Baumann L, Schonborn C** (1986): Risk of transmission of sexually transmitted diseases by cryopreserved semen. *Andrologia*, 18: 323-5.
- Hubalek Z** (2003): Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46: 205-29.
- McBurnie LD, Bardo B** (2002): Validation of sterile filtration of liquid nitrogen. *Pharmaceutical Technology North America*, 26(10): 74-82.
- Morris GJ** (2005): The origin, ultrastructure and microbiology of the sediment accumulating in liquid nitrogen storage vessels. *Cryobiology*, 50: 231-8.
- Piasecka-Serafin M** (1972): The effect of the sediment accumulated in containers under experimental conditions on the infection of semen stored directly in liquid nitrogen (-196°C). *Bull Acad Pol Sci Biol*, 20: 26-37.

11. **Polge C, Smith AU** (1949): Parkes AS. Revital of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature*, 164: 666
12. **Pomeroy KO, Harris S, Conaghan J, Papadakis M, Centola G, Basuray R** (2010): Storage of cryopreserved reproductive tissues: evidence that cross-contamination of infectious agents is a negligible risk. *Fertil Steril*, 94: 1181-8.
13. **Schaffer TW, Everett J, Silver GH, Came PE** (1976): Biohazard potential: recovery of infectious virus from the liquid nitrogen of a virus repository. *Health Lab Sci*, 13: 23-4. (Abstrakt)
14. **Schiewe M, Hasler J** (2010): General hygiene and quality control practices in an embryo-production laboratory. *Manual of the International Embryo Transfer Society*, fourth ed., Stringfellow D, Givens D (Eds.), IETS, pp. 73-86.
15. **Scholz, EC** (2012): The Problem of Contamination: Open vs. Closed vs. Semi-Closed Vitrification Systems *Current Frontiers in Cryopreservation*, Editor: Prof. Igor Katkov, ISBN: 978-953-51-0302-8, Intech; 105-131.
16. **Stringfellow DA, Wolfe DF, McGuire JA, Lauerman LH, Gray BW, Sparling PH** (1986): Effects of embryo-freezing and thawing techniques on the survivability of *Brucella abortus*. *Theriogenology*, 26: 553-9.
17. **Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM** (1995): Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet*, 346: 137-9.
18. **Tedeschi R, De Paoli P** (2011): Collection and preservation of frozen microorganisms. *Methods Mol Biol*, 675: 313-26.
19. **Thibier MD, Wagner HG** (2002): World statistics for artificial insemination in cattle. *Livest Prod Sci*, 74: 203-12.
20. **Wallis C, Melnik JL** (1968): Stabilization of enveloped viruses by dimethyl sulfoxide. *J. Virol*, 2: 953-4.
21. **Wierzbowski S** (1985): Bull semen opportunistic pathogen and ubiquitous microflora. In: *Disease Control in Semen and Embryos*. FAO Animal Production and Health Paper, 23: 21-8.
22. **Van der Maaten MJ** (1987): Determining the health status of embryos for international movement. *International Embryo Movement*, Hare WCD, Seidel SM (Eds.), IETS,; 147-61.
23. **Yavaş TK, Daşkın A** (2012): Effect of alternative cryopreservation procedures on bull semen. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 59: 231-234.