

## Долгосрочное хранение фиксированных штаммов вируса бешенства L. Pasteur и CVS при температурах $-20$ и $-80^{\circ}\text{C}$ с применением защитных сред

В.В. Варяница<sup>1,2</sup>, И.П. Высеканцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков, Украина

<sup>2</sup>ПАО «ФАРМСТАНДАРТ-БИОЛЕК», г. Харьков

## Long-Term Storage of Rabies Virus Fixed Strains L. Pasteur and CVS at Temperatures of $-20$ and $-80^{\circ}\text{C}$ Using Protective Media

V.V. Varianytsia<sup>1,2</sup>, I.P. Vysekantsev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>PJSC 'Pharmstandard-Biolik', Kharkiv, Ukraine

Наличие эффективных методов долгосрочного хранения фиксированных штаммов вируса бешенства играет важную роль при производстве антирабических препаратов.

Цель работы – исследовать сохранность фиксированного вируса бешенства после долгосрочного низкотемпературного хранения с использованием защитных сред.

Объектами исследования были фиксированные штаммы вируса бешенства L. Pasteur и CVS. Вирус накапливали в ростовой среде на основе DMEM с 0,1% сывороточного бычьего альбумина. В вирусную суспензию вносили сахарозу (2,5; 5; 7,5 и 10%), глицерин (2,5; 5; 7,5 и 10%), диметилсульфоксид (ДМСО) (2,5; 5; 7,5 и 10%), желатин (1 и 3%), альгинат натрия (1; 2 и 3%) и пептон (2,5; 5; 7,5 и 10%). Образцы замораживали при  $-20$  и  $-80^{\circ}\text{C}$ . Сохранность образцов оценивали через 1–12 месяцев (срок наблюдения).

Установлено, что при хранении обоих штаммов наиболее значимо на инфекционную активность вируса влияла температура, а затем срок хранения и присутствие в среде защитных веществ.

Хранение штамма L. Pasteur при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение недели приводило к снижению инфекционной активности во всех образцах по сравнению с исходным контролем. При последующих сроках хранения наблюдалось дальнейшее снижение данного показателя. Через 12 месяцев наиболее высокие показатели сохранности вируса отмечались в образцах с сахарозой (2,5–10%), глицерином (2,5–10%) и ДМСО (5%). В процессе хранения при  $-80^{\circ}\text{C}$  во всех образцах, активность вируса также снижалась. Через 12 месяцев наиболее высокую сохранность обеспечивали среды с 3% желатина и 5–10% сахарозы. Во все сроки хранения при  $-80^{\circ}\text{C}$  показатель сохранности был выше, чем при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

В экспериментах со штаммом CVS более высокую сохранность вируса также обеспечивало хранение при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Через неделю при этой же температуре 100%-я сохранность инфекционной активности отмечалась в образцах с желатином (1–3%), через 12 месяцев – в средах с сахарозой (5–10%), а при  $-20^{\circ}\text{C}$  – в средах с 3% желатина и 5–10% сахарозы.

Таким образом, температура  $-80^{\circ}\text{C}$  более эффективна для хранения исследованных штаммов, чем  $-20^{\circ}\text{C}$ . Универсальной защитной средой для их хранения до 12 месяцев при температурах  $-20$  и  $-80^{\circ}\text{C}$  является ростовая среда на основе DMEM с добавлением 0,1% сывороточного бычьего альбумина и 5–10% сахарозы.

The availability of effective methods for a long-term storage of rabies virus fixed strains plays an important role in the antirabies vaccines production.

The aim of the study was to investigate the fixed rabies virus survival after long-term low-temperature storage using protective media.

The research objects were fixed rabies virus strains of L. Pasteur and CVS. The viral particles were re-suspended in a DMEM-based growth medium supplemented with 0.1% serum bovine albumin. The following protective substances were added to the virus suspension: sucrose (2.5, 5, 7.5 and 10%), glycerol (2.5, 5, 7.5 and 10%), dimethyl sulfoxide (DMSO) (2.5, 5, 7.5 and 10%), gelatin (1 and 3%), sodium alginate (1, 2 and 3%) and peptone (2.5, 5, 7.5 and 10%). The samples were frozen in freezers at  $-20$  and  $-80^{\circ}\text{C}$ . The virus survival was assessed after 1–12 months (observation period).

During storage of both strains the most significant contribution to the virus infectious activity change was shown to be made by temperature, and then by the storage period and protective substances presence in the medium.

After storage of L. Pasteur strain at  $-20^{\circ}\text{C}$  for a week, there was a decrease in infectious activity in all the samples in comparison with the initial control. During further storage infectious activity decreased even more. After 12 months of storage, the highest virus survival was in the samples with sucrose (2.5–10%), glycerol (2.5–10%), and DMSO (5%). During storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  in all the samples a reduction was also found in the virus infectious activity. After 12 months, the highest virus survival was provided by the media with 3% gelatin and 5–10% sucrose. For all the storage periods at  $-80^{\circ}\text{C}$ , the survival of infectious activity was higher than at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

In experiments with the CVS strain, higher levels of virus safety were also found after storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ . In a week of storage at this temperature, 100% infectious activity was noted in the samples with gelatin (1–3%). The highest survival after 12 months at  $-80^{\circ}\text{C}$  was provided by the media with sucrose (5–10%), at  $-20^{\circ}\text{C}$  – with 3% gelatin and 5–10% sucrose.

Thus, the temperature of  $-80^{\circ}\text{C}$  was more effective for storage of the studied strains if compared with  $-20^{\circ}\text{C}$ . The optimal protective medium for storage of industrial rabies virus strains for up to 12 months at temperatures of  $-20$  and  $-80^{\circ}\text{C}$  was the DMEM-based growth medium supplemented with 0.1% serum bovine albumin and 5–10% sucrose.

