

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ВАРЯНИЦЯ ВІКТОРІЯ ВАЛЕРІЇВНА

УДК: 57.086.13:602:578.824.11:615.371

ДИСЕРТАЦІЯ

**ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ВІРУСУ СКАЗУ ПРИ НИЗЬКИХ
ТЕМПЕРАТУРАХ**

за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ (В.В. Варяниця)

Науковий керівник (консультант):

к. м. н., ст. н. с. І.П. Висеканцев

Харків – 2021

АНОТАЦІЯ

Варяниця В.В. Збереженість промислових штамів вірусу сказу при низьких температурах. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2021.

Сказ – зоонозне інфекційне захворювання, збудником якого є вірус сказу, який уражує центральну нервову систему. Сказ має найвищу смертність серед інших інфекційних хвороб. На даний час не існує методів діагностики сказу до появи клінічних ознак, після прояву яких це захворювання є невиліковним. Україна посідає третє місце в Європі за поширенням сказу серед диких і домашніх тварин. Кожного року реєструють випадки підозри на інфікування або захворювання сказом у людей. Для профілактики та контролю сказу проводять пероральну імунізацію диких і парентеральну імунізацію домашніх тварин. Людям із підозрою на інфікування (укус скаженою або підозрілою на сказ твариною, контакт із слиною таких тварин) проводять постекспозиційну профілактику сказу за допомогою специфічних імуноглобулінів та антирабічних вакцин. Також здійснюють вакцинацію людей із великим ризиком інфікування в умовах виконання професійних обов'язків.

Сучасне серійне виробництво антирабічних препаратів потребує тривалого зберігання великих об'ємів очищених і стандартизованих суспензій промислових штамів вірусу сказу та в меншій мірі – їх ліофілізатів. Для цього в технологічні схеми виробництва введено систему головного та робочого банків вірусу. Стабільність вірусних суспензій у ході їх зберігання має важливе значення для безперервного забезпечення виробництва посівним матеріалом, проведення контролю якості антирабічних вакцин та імуноглобулінів, гарантії надійності серологічних методів діагностики. Ліофілізовані зразки призначені для депонування промислових штамів вірусу сказу та їх дублювання у головному банку виробництва. У зв'язку з вищевикладеним набула актуальності проблема

розробки ефективних методів довгострокового зберігання суспензій і ліофілізатів промислових штамів вірусу сказу в умовах виробництва антирабічних препаратів.

Головними методами зберігання більшості вірусів у дослідницьких і виробничих цілях є ліофілізація та заморожування за помірно низьких і низьких температур. Ліофілізовані віруси стабільні, невимогливі при тривалому зберіганні та транспортуванні. Недоліками ліофілізації є те, що цей метод дозволяє зберігати лише невеликі об'єми вірусів, терміни їх зберігання мають обмеження, для використання цієї технології необхідне спеціальне обладнання, яке зазвичай відсутнє на більшості виробництв та в лабораторіях. Після зберігання і регідратації ліофілізовані віруси потрібно додатково пасувати. Зберігання за помірно низьких і низьких температур забезпечує стабільність віріонів і залежно від температурного режиму зберігання захищає їх від дії пошкоджувальних факторів оточуючого середовища. Для реалізації цього методу використовують зберігання матеріалу у морозильних камерах (між -20 та -80°C), у рідкому азоті та його парах (від -140 до -196°C).

Для уникнення пошкоджувальної дії фізико-хімічних факторів, пов'язаних із процесами кристалізації-рекристалізації та сублімації води, під час кріоконсервування та ліофілізації вірусу використовують захисні середовища. Зазвичай ці середовища складаються з буферних розчинів для підтримання рН і білків для стабілізації нуклеокапсидів. Часто до них додають інші речовини, які підтримують оптимальну осмолярність та рН у межах від 7,0 до 8,0, або на яких віруси можуть адсорбуватися.

На сьогодні дослідження щодо зберігання за різних низьких температур та із ліофілізації вірусу сказу (ВС) мають фрагментарний характер. Більшість із них присвячена короткостроковому зберіганню вірусу. Відсутні порівняльні дані щодо впливу температурних режимів, складу середовищ консервування та термінів зберігання на ВС у процесі довгострокового зберігання.

У зв'язку з вищевикладеним дослідження впливу вказаних факторів на ВС дозволило розробити технології довгострокового зберігання промислових штамів ВС за різних низьких температур і після ліофілізації в умовах виробництва

антирабічних препаратів. Водночас результати проведеного дослідження доповнюють концепції щодо особливостей механізмів кріопшкоджень і кріозахисту складних вірусів.

У дисертаційній роботі вперше показано, що, на відміну від механізмів кріопшкоджень клітин, пошкоджувальними факторами для вірусу сказу є «ефекти розчинів», агрегація, контакт віріонів з кристалами льоду.

Вперше виявлено відмінності у чутливості штамів CVS та L. Pasteur, які мають спільне походження, до пошкоджувальної дії процесу заморожування та умов зберігання за низьких температур.

Вперше показано захисну дію різних кріопротекторних речовин (сахарози, гліцерину, ДМСО, желатину) на етапах заморожування до -20 , -80°C та зберігання вірусу сказу штамів CVS та L. Pasteur за цих температур. Встановлено, що вираженість захисної дії вказаних кріопротекторних речовин відносно вірусу сказу різна на етапах заморожування і змінюється під час зберігання за температур -20 , -80°C .

Вперше експериментально обґрунтовано склад захисних середовищ для довгострокового зберігання штамів вірусу сказу CVS та L. Pasteur за температур -80 та -196°C та для зберігання цих штамів терміном до 6-ти місяців за температури -20°C . Для довгострокового зберігання за температур -80 та -196°C доцільно використовувати ростове середовище на основі DMEM із додаванням 5% сахарози, 5% гліцерину та їх суміші. Ці захисні середовища через 24 місяці (термін спостереження) зберігання за температури -80°C забезпечують збереженість 80–83% інфекційної активності штаму CVS і 71–74% штаму L. Pasteur та за температури -196°C – 94% штаму CVS і 83–87% штаму L. Pasteur. Для короткострокового зберігання при -20°C рекомендовано використовувати ростове середовище із додаванням 2,5–10% сахарози або гліцерину. Через 6 місяців за температури -20°C зберігається 80–84% інфекційної активності штаму CVS та 80–88% – штаму L. Pasteur.

Вперше показані особливості зберігання вірусу сказу штамів CVS та L. Pasteur за позитивних температур. Встановлено, що температурний режим 37°C

непридатний для зберігання вірусу. Температуру 5°C можна використовувати за виробничої необхідності для нетривалого зберігання у відповідному захисному середовищі.

Вперше встановлено, що ступінь впливу температур зберігання та складу захисних середовищ на інфекційну активність ліофілизованого вірусу сказу змінюється залежно від термінів зберігання. Під час зберігання ліофілизованого вірусу протягом 24-х місяців (термін спостереження) за температур 5, -20, -80°C через 6 місяців відмічався більший вплив складу захисних середовищ, через 12 місяців вплив обох чинників був однаковим, через 18–24 місяці визначальним чинником була температура зберігання.

Експериментально обґрунтовано склад захисного середовища для ліофілізації та подальшого зберігання вірусу сказу за температур 5, -20, -80°C: ростове середовище на основі DMEM із додаванням суміші 1% желатину та 5% сахарози. Використання цього середовища дозволило зберегти після процесу ліофілізації 91% від вихідної інфекційної активності штаму L. Pasteur. Після наступного зберігання протягом 24-х місяців за температур 5, -20 та -80°C збереглося 68, 80 та 87% від вихідної інфекційної активності вірусу відповідно.

Із використанням результатів, що представлені у дисертації, в АТ «БІОЛІК» (Харків, Україна) створена і підтримується система головного та робочого банків промислових штамів ВС, у технологічні процеси виробництва антирабічних вакцин впроваджено методи зберігання ВС перед інактивацією, розроблено ветеринарний препарат «Антиген вірусу сказу для імунізації коней-продуцентів», проведено валідацію та впроваджено у систему контролю методики визначення специфічної активності препарату «Імуноглобулін антирабічний (кінський)».

Ключові слова: вірус сказу, культура клітин, ліофілізація, довгострокове зберігання, збереженість вірусу, інфекційна активність вірусу, антирабічні препарати, захисні середовища.

ANNOTATION

Varianytsia V.V. Preservation of rabies virus industrial strains at low temperatures. – The qualifying scientific paper as a manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences in specialty 03.00.19 – cryobiology. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2021.

Rabies is a zoonotic infectious disease, which is caused by the rabies virus that affects the central nervous system. Rabies has the highest mortality rate among other infectious diseases. Currently, there are no methods for diagnosing rabies before the advent of clinical signs, after the manifestation of which the disease is incurable. Ukraine ranks the 3rd in Europe in rabies spread among wild and domestic animals. Cases of suspected rabies infection or disease are reported each year in humans. For the prevention and control of rabies, oral immunization of wild and parenteral one of domestic animals are conducted. In people with suspected infection (bite by a rabid or suspected rabid animal, contact with the saliva of such animals) post-exposure prophylaxis by rabies specific immunoglobulins and rabies vaccines is performed. People with a high risk of infection during professional activity are also vaccinated.

Modern serial manufacturing of rabies products requires a long-term storage of large volumes of purified and standardized industrial rabies virus strains suspensions and to lesser extent it necessitates a storage of frozen-dried samples. For this reason the system of the main and operating virus banks was introduced into technological manufacturing scheme. The stability of the viral suspension during storage is important for uninterrupted supplying of manufacturing with the seeding material, carrying out of quality control of rabies vaccines and immunoglobulins, guarantee of serological diagnostic methods reliability. Frozen-dried samples are intended for preservation of rabies virus industrial strains and for their duplication in the main manufacturing bank. Due to the above, the problem of the development of effective methods for a long-term storage of rabies virus industrial strains suspensions and freeze-dried samples in manufacturing of rabies products has become relevant.

The main methods of storage for the most of the viruses in research and manufacturing purposes are freeze-drying and freezing at moderately low and low temperatures. Frozen-dried viruses are stable, undemanding during long-term storage and transportation. The disadvantages of freeze-drying is that this method allows only small amounts of viruses storage, their storage period is limited, the use of this technology requires special equipment, which is usually absent in most industries and laboratories. After storage and rehydration the frozen-dried viruses need to be further passaging. Storage at moderately low and low temperatures ensures the stability of virions and depending on the storage temperature protects them against damaging impact of the environmental factors. To implement this method, the material storage in freezers (between -20 and -80°C), in liquid nitrogen and its vapors (from -140 to -196°C) is used.

To avoid the damaging effects of physical and chemical factors associated with processes of crystallization-recrystallization and sublimation of water, during cryopreservation and freeze-drying of the virus, protective media are applied. Typically, these media consist of buffer solutions to maintain pH and proteins for nucleocapsids stabilization. Often other substances that maintain optimal osmolarity and pH within range from 7.0 to 8.0, or at which the viruses can be adsorbed, are added to them.

To date, researches on storage at various low temperatures and with freeze-drying of rabies virus (RV) are fragmentary. Most of them dedicated to a short-term storage of the virus. There are no comparative data about the influence of storage temperature regimens, composition of protective media and storage period on the RV during a long-term storage. Due to the above, the research of the impact of these factors on the RV allowed the development of techniques for a long-term storage of industrial RV strains at various low temperatures and after freeze-drying when manufacturing anti-rabies products. At the same time the results of the study complement the concepts regarding the features of mechanisms of complex viruses cryodamage and cryoprotection.

In the thesis for the first time it is shown that in contrast to the mechanisms of cells cryoinjury, damaging factors for the rabies virus are the “effects of solutions”, aggregation, contact of virions with ice crystals.

The differences in susceptibility of CVS and L. Pasteur strains, which have a common origin, to the damaging effects of the freezing process and storage conditions at low temperatures were for the first time discovered.

The protective effect of various cryoprotective substances (sucrose, glycerol, DMSO, gelatin) was shown at the stages of freezing down to -20 , -80°C and storage at these temperatures. It was established that the level of the protective action of these cryoprotective substances against rabies virus was different at freezing stages and changed during storage at temperatures of -20 , -80°C .

The composition of protective media for a long-term storage of rabies virus CVS and L. Pasteur strains at temperatures of -80 and -196°C and for storage of these strains for up to 6 months at a temperature of -20°C was experimentally substantiated. For a long-term storage at temperatures of -80 and -196°C it is advisable to use the DMEM- based growth medium supplemented with 5% sucrose, 5% glycerol and mixtures thereof. These protective media after 24 months of storage (observation period) at the temperature of -80°C provide the preservation of 80–83% of the CVS strain infectious activity and 71–74% of the L. Pasteur strain infectious activity and at a temperature of -196°C – 94% of the CVS strain and 83–87% of the L. Pasteur strain activity. For a short-term storage at -20°C , it is recommended to use a growth medium supplemented with 2.5–10% sucrose or glycerol. After 6 months at a temperature of -20°C , 80–84% of the infectious activity of the CVS strain and 80–88% of the L. Pasteur strain are preserved.

Storage features of rabies virus CVS and L. Pasteur strains at positive temperatures are for the first time shown. It has been found that temperature regimen of 37°C is not suitable for the virus storage. A temperature of 5°C is possible to use in production needs for short-term storage in appropriate protective medium.

For the first time it has been established that the degree of storage temperatures and protective media composition influence on the infectious activity of frozen-dried

rabies virus changes depending on the storage period. During storage of freeze-dried virus within 24 months (observation period) at temperatures of 5, -20, -80°C after 6 months, the influence of protective medium composition was higher, 12 months later the influence of both factors was the same, after 18–24 months storage temperature was the determining factor.

The composition of protective media for freeze-drying and subsequent storage of rabies virus at temperatures of 5, -20, -80°C was experimentally substantiated: DMEM-based growth medium supplemented with a mixture of 1% gelatin and 5% sucrose. The use of this medium allowed the preservation of 91% of the L. Pasteur strain original infectious activity after freeze-drying. After subsequent storage for 24 months at temperatures of 5, -20, -80°C, 68, 80 and 87% of the virus original infectious activity was preserved, respectively.

Using the results presented in the thesis, the system of the main and operating banks of industrial RV strains has been created and supported at the JSC "BIOLIK" (Kharkiv, Ukraine), methods of RV storage before inactivation were introduced into the technological processes of rabies vaccines production, developed veterinary product “Rabies virus antigen for horse immunization”, method of specific activity determination of the “Rabies Immunoglobulin (equine)” product was validated and introduced into the control system.

Key words: rabies virus, cell culture, freeze-drying, long-term storage, virus preservation, virus infectious activity, rabies products, protective media.

**СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ТА
ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ**

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті у фахових виданнях України

1. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Infectious activity of L. Pasteur rabies virus vaccine strain frozen-dried in various protective media and then stored at various temperatures. Probl Cryobiol Cryomed. 2018; 28(4): 333–42. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo28.04.333> (Scopus).

2. **Варяница ВВ**, Высеканцев ИП. Защитные среды для хранения стандартного штамма вируса бешенства CVS при температурах –20, –80°C. Вестник проблем биологии и медицины. 2019; 4(1): 205–11. DOI: <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2019-4-1-153-205-211>.

3. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Impact of storage temperature regimens and protective media composition on rabies virus CVS strain preservation. Probl Cryobiol Cryomed. 2020. 30(2): 148–57. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo30.02.148> (Scopus).

Статті в наукових періодичних виданнях інших країн

4. **Burkova VV**, Vysekantsev IP, Lavrik AA. Preservation of infectious activity of rabies virus industrial strains stored at various temperatures. Electronic periodical publication of SFU «Live and bioconcent systems». 2014; 9: 1–11.

5. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Protective media for storage of L. Pasteur rabies virus strain at different temperatures. IOSR Journal Of Pharmacy. 2019; 9(1): 9–18.

6. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Influence of protective media composition and storage temperatures on preservation of rabies virus vaccine strain L. Pasteur. IOSR Journal Of Pharmacy And Biological Sciences. 2020; 15(3): 20–9. DOI: <https://doi.org/10.9790/3008-1503012029>.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

Оглядові статті в журналах, які входять до міжнародних наукометричних баз

7. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Storage methods of complex RNA viruses.

Probl Cryobiol Cryomed. 2017; 27(4): 287–95. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo27.04.287> (Scopus).

Тези наукових доповідей конференцій

8. **Буркова ВВ**, Лаврік ОА. Інфекційна активність промислових штамів вірусу сказу після зберігання при різних низьких температурах. В: Збірник тез VIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського «Молодь і поступ біології»; 2013 Квіт. 16–19; Львів. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка; 2013. с. 279–80.

9. **Burkova VV**, Pishko OV. Infectious activity of industrial strains of rabies virus after storage at $-20, -80^{\circ}\text{C}$. Probl Cryobiol Cryomed. 2014; 24(2): 175.

10. **Буркова ВВ**, Лаврик АА, Мороз ОЕ, Великий ІС. Вирулентность контрольного штамма вируса бешенства CVS (20%-мозговая суспензия) в зависимости от температуры хранения. В: Сборник тезисов 19-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века»; 2015 Апр. 20–24; Пущино. Пущино: Межфакультетский научно-образовательный центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; 2015. с. 164–5.

11. **Burkova VV**, Lavrik AA. Activity of rabies virus strain CVS (20% cerebral suspension) after storage at different temperatures. Probl Cryobiol Cryomed. 2015; 25(2): 170.

12. **Burkova VV**, Lavrik AA, Vysekantsev IP. Infectious activity of attenuated rabies virus strains L. Pasteur and CVS after low temperature storage. In: Abstract book of the 1st International conference of young scientists 2015 (CYS-2015); 2015 Sep. 21–25; Kyiv. Lutsk: Vezha-Print; 2015. p. 113.

13. **Burkova VV**. Storage of rabies virus strains L. Pasteur and CVS at low temperatures using cryoprotectants. Probl Cryobiol Cryomed. 2016; 26(2): 162. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo26.02.162>.

14. Yermolenko NA, Savonova MS, **Varianytsia VV**, Kalyuzhnaya OS. Method of producing a suspension of rabies virus strain L. Pasteur for the production of the

rabies vaccine. In: Abstract book of the XXIV International scientific and practical conference of young scientists and students “Topical issues of new drugs development”; 2017 Apr. 20; Kharkiv. Kharkiv: NUPh; 2017. p. 349–50.

15. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Freeze-drying and subsequent storage of fixed L. Pasteur strain rabies virus. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2017; 27(2): 162. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo27.02.162>.

16. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Preservation of lyophilized rabies virus strain L. Pasteur after storage at temperatures of 5, –20 and –80°C. In: Abstract book of 2nd International conference “Smart Bio”; 2018 May 03–05; Kaunas, Lithuania. Kaunas: Vytautas Magnus University; 2018. p. 352.

17. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Long-term storage of rabies virus fixed strains L. Pasteur and CVS at temperatures of –20 and –80°C using protective media. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2018; 28(2): 169. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo28.02.169>.

18. Стрилец ОП, Щетинина МВ, **Варяница ВВ**. Время инактивации вируса бешенства при получении антирабических вакцин. В: Збірник наукових праць VII Науково-практичної дистанційної конференції з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології», 2018 Лист. 23; Харків. Харків: Вид-во НФаУ; 2018. с. 368–70.

19. Varianytsia VV, Vysekantsev IP. Storage of standard fixed rabies virus CVS strain in protective media with sucrose, glycerol and maltose at different temperatures during one year. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2019; 29(2): 153. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo29.02.153>.

20. **Варяница ВВ**, Новікова ОЮ. Порівняння методів RFFIT та MNT при контролі титрів антирабічних антитіл в препараті антирабічного імуноглобуліну. В: Proceedings of the 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation; 2019 June 18–21; Yaremche, Ukraine. Львів. С. 58.

21. **Варяница ВВ**, Высеканцев ИП. Применение защитных сред для долгосрочного хранения фиксированного штамма вируса бешенства L. Pasteur при низких температурах. В: Збірник тез наукових робіт учасників міжнародної

науково-практичної конференції «Медична наука та практика: виклики і сьогодення»; 2019 Серп. 23–24; Львів. Львів: ГО «Львівська медична спільнота»; 2019. с. 87–90.

22. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Effectiveness of protective media applying for long-term storage of the rabies virus L. Pasteur strain at various low temperatures. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2020; 30(3): 283. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo30.03.283>.

Патенти України на корисну модель

23. Новікова ОЮ, **Варяниця ВВ**, винахідники; патентовласник ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК». Спосіб кількісного визначення антирабічного антигену in vitro в інактивованих антирабічних вакцинах. Патент України на корисну модель №118343. Публ. 10.08.2017. Бюл. № 15.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	30
1.1. Епізоотична ситуація щодо сказу у світі	30
1.2. Характеристика збудника сказу	32
1.3. Патогенез сказу	34
1.4. Діагностика сказу.....	36
1.5. Профілактика сказу.....	37
1.6. Антирабічні вакцини та імуноглобуліни.....	39
1.7. Технологія виготовлення антирабічних вакцин із використанням культур клітин.....	42
1.8. Актуальність розробки методів довгострокового зберігання та створення колекцій банків вірусів.....	43
1.8.1. Зберігання вірусів за позитивних та різних низьких температур.....	45
1.8.2. Ліофілізація вірусів	53
1.8.3. Застосування захисних середовищ під час зберігання вірусів за низьких температур та ліофілізації.....	55
1.8.4. Зберігання вірусу сказу	65
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	68
2.1. Об'єкти дослідження	68
2.2. Заходи безпеки	68
2.3. Отримання суспензії вірусу	69
2.4. Визначення інфекційної активності вірусу.....	69
2.5. Заморожування штамів CVS та L. Pasteur до -20 , -80°C і зберігання за цих температур протягом 12-ти місяців	72
2.6. Зберігання штаму CVS за різних температур протягом 24-х місяців	74
2.7. Зберігання штаму L. Pasteur за різних температур протягом 24-х місяців....	75
2.8. Ліофілізація штаму L. Pasteur	75

2.9. Статистичний аналіз результатів	76
РОЗДІЛ 3 ВПЛИВ РЕЧОВИН ІЗ РІЗНИМИ МЕХАНІЗМАМИ КРІОЗАХИСНОЇ ДІЇ НА ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ВІРУСУ СКАЗУ ПРОТЯГОМ РОКУ ЗА ТЕМПЕРАТУР –20 ТА –80°C.....	78
3.1. Інфекційна активність ВС штамів CVS та L. Pasteur після інкубації за кімнатної температури з кріопротекторними домішками до середовищ консервування	78
3.2. Вплив складу середовищ консервування і температурних режимів зберігання на інфекційну активність вірусу сказу штаму CVS	81
3.2.1. Вплив заморожування до –20, –80°C та складу середовищ консервування на інфекційну активність вірусу сказу штаму CVS	81
3.2.2. Динаміка інфекційної активності стандартного штаму вірусу сказу CVS під час зберігання протягом року у різних середовищах консервування за температур –20 та –80°C	82
3.3. Вплив складу середовищ консервування і температурних режимів зберігання –20, –80°C на інфекційну активність вірусу сказу штаму L. Pasteur.....	92
3.3.1. Вплив складу середовищ консервування та заморожування до –20, –80°C на інфекційну активність вірусу сказу штаму L. Pasteur.....	92
3.3.2. Динаміка інфекційної активності вірусу сказу штаму L. Pasteur під час зберігання протягом року у різних середовищах консервування	93
РОЗДІЛ 4 ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРНИХ РЕЖИМІВ ЗБЕРІГАННЯ, СКЛАДУ ЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ І ТЕРМІНІВ ЗБЕРІГАННЯ НА ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ВІРУСУ СКАЗУ CVS ТА L. PASTEUR ПІСЛЯ ДОВГОСТРОКОВОГО ЗБЕРІГАННЯ.....	107
4.1. Вплив температурних режимів, складу захисних середовищ і термінів зберігання на збереженість стандартного штаму вірусу сказу CVS	107
4.1.1. Інфекційна активність стандартного штаму вірусу сказу CVS після зберігання протягом тижня за різних температур.....	107
4.1.2. Динаміка інфекційної активності стандартного штаму вірусу сказу CVS під час зберігання за різних температур протягом 24-х місяців.....	108

4.1.3. Інфекційна активність стандартного штаму вірусу сказу CVS після зберігання за низьких температур у різних захисних середовищах протягом 24-х місяців	113
4.2. Вплив температурних режимів, складу захисних середовищ і термінів зберігання на збереженість штаму L. Pasteur	115
4.2.1. Інфекційна активність штаму вірусу сказу L. Pasteur в ході зберігання в різних захисних середовищах за температури 37°C	115
4.2.2. Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur в ході зберігання в різних захисних середовищах за температури 5°C	116
4.2.3. Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur в ході зберігання в різних захисних середовищах за температур -20, -80 и -196°C протягом 24-х місяців	118
РОЗДІЛ 5 ЛІОФІЛІЗАЦІЯ ШТАМУ L. PASTEUR ТА ЙОГО ПОДАЛЬШЕ ЗБЕРІГАННЯ ЗА РІЗНИХ ТЕМПЕРАТУР	127
5.1. Оцінка зовнішнього вигляду ліофілізату вірусу	127
5.2. Визначення часу відновлення ліофілізату вірусу	128
5.3. Вплив процесу ліофілізації і складу захисних середовищ на інфекційну активність вірусу сказу	129
5.4. Вплив температурних умов зберігання та складу захисних середовищ на інфекційну активність ліофілізованого вірусу сказу	131
УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	139
ВИСНОВКИ	147
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	150
ДОДАТОК А Список публікацій здобувача за темою дисертації та відомості про апробацію результатів дисертації	176
ДОДАТОК Б Апробація матеріалів дисертації	180
ДОДАТОК В Матеріали допоміжного характеру	182

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БПЛ	– бета-пропіолактон
ВНА	– віруснейтралізуючі антитіла
ВООЗ	– Всесвітня Організація Охорони Здоров'я
ВПГ	– вірус простого герпесу
ВРХ	– велика рогата худоба
ВС	– вірус сказу
ДМСО	– диметилсульфоксид
ІФА	– імуноферментний аналіз
МО	– міжнародні одиниці
ПЕП	– постекспозиційна профілактика
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
ПрЕП	– передекспозиційна профілактика
РНК	– рибонуклеїнова кислота
РНП	– рибонуклеопротеїновий комплекс
РС	– ростове середовище
РСВ	– респіраторно-синцитіальний вірус
СА	– сироватковий альбумін
ФС	– фетальна сироватка
ФСБ	– фосфатно-сольовий буфер
ЦНС	– центральна нервова система
ЦПМ	– цитоплазматична мембрана
CCID	– інфекційна доза для культури клітин (cell culture infective dose)
DMEM	– середовище Ігла, модифіковане Дульбекко (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DRIT	– прямий швидкий імуногістохімічний тест (direct rapid immunohistochemistry test)
FAT	– метод флуоресцентних антитіл (fluorescent antibody test)

- FAVN – тест нейтралізації вірусу флуоресціюючими антитілами (fluorescent antibody virus neutralization)
- FFD – фокус-утворююча доза (focus-forming dose)
- FFU – фокус-утворюючі одиниці (focus-forming units)
- ID – інфікуюча доза (infective dose)
- LD – летальна доза (lethal dose)
- RFFIT – експрес-тест фокус-флуоресцентного інгібування (rapid fluorescent focus inhibition test)
- RIDT – швидкий імунодіагностичний тест (rapid immunodiagnostic test)
- RIG – антирабічний імуноглобулін (rabies immunoglobulins)
- RV – rabies virus
- TCID – інфекційна доза для тканинної культури (tissue culture infective dose)

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження.

Сказ – зоонозне емерджентне інфекційне захворювання, збудником якого є вірус родини *Rhabdoviridae* із роду *Lyssavirus*, який уражує центральну нервову систему (ЦНС) та викликає вірусний енцефаліт [1–11]. Вірус надходить у організм, як правило, через інфільтрацію зараженої вірусом слини скаженої тварини в рану у місці укусу або через контакт подряпини, відкритої рани і слизової оболонки з джерелом зараження [1–4, 9, 12–17]. За даними Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я (ВООЗ) сказ зустрічається більш ніж у 150-ти країнах та територіях світу [8, 14, 18–20] та має найвищу смертність серед інших інфекційних хвороб [2, 3, 10]. Кількість людських смертей в усьому світі внаслідок сказу, опосередкованого собаками, оцінюється в 59 000 щорічно [1–4, 8–10, 14–16, 20–30]. Оскільки вірус сказу може інфікувати всіх ссавців, він може передаватися між різними видами резервуарів і людьми за допомогою проміжних видів, які зазвичай не асоціюються зі сказом [1, 7–9, 13, 17–19, 31, 32].

Україна посідає третє місце в Європі за поширенням сказу серед диких і домашніх тварин. Кожного року реєструють випадки підозри на інфікування або захворювання сказом людей [33]. На даний час не існує методів діагностики сказу до появи клінічних ознак, після прояву яких це захворювання є невиліковним [5, 10]. Однак, існує можливість попередити це захворювання завдяки наявності та доступності ефективної профілактики сказу у людей та контролю цього захворювання серед тваринних резервуарів [1, 4, 21]. Для профілактики та контролю сказу проводять пероральну імунізацію диких та парентеральну імунізацію домашніх тварин. Людям із підозрою на інфікування (укус скаженою або підозрілою на сказ твариною, контакт із слиною таких тварин) проводять постекспозиційну профілактику сказу за допомогою специфічних імуноглобулінів та антирабічних вакцин. Також здійснюють вакцинацію людей із великим ризиком інфікування в умовах виконання професійних обов'язків. Вакцина сприяє появі імунної відповіді, стимулюючи утворення специфічних антитіл, які

опосередковують інактивацію вірусу, що вже був введений в тканини під час укусу скаженою твариною або потрапив в організм внаслідок контакту з інфікованими субстратами чи матеріалами [8, 34, 35]. Антирабічні імуноглобуліни використовують для пасивної імунізації, яка запобігає поширенню інфекції після укусу скаженою твариною [2, 7, 8, 10, 35].

Сказ займає чільне місце в історії розробки вакцин, оскільки це було третє захворювання, для запобігання якого використали вакцину [6, 36]. Першу антирабічну вакцину розробили Луї Пастер і Еміль Ру ще у 1880-х роках. Багато десятиліть для виробництва вакцини проти сказу використовували технологію, запропоновану Л. Пастером і Е. Ру, – внутрішньомозкове зараження тварин, переважно кролів, вакцинним штамом ВС. Така технологія і сама вакцина мають ряд недоліків, у тому числі високу реактогенність вакцини [5, 6, 8, 15, 24, 31, 32, 34, 37–41]. Знання того, що ВС може поширюватися в більшість органів і тканин тіла, в яких часто здатний ефективно розмножуватися, наштовхнули дослідників на те, що ВС можна культивувати в самих різних клітинах [42]. Зараз існує ряд постійних клітинних ліній, які використовують для культивування та накопичення вірусу сказу в ході виготовлення ветеринарних вакцин, такі як клітини нирки новонародженого сірійського хом'яка, лінія 21 (ВНК-21), фібробласти нирок хом'яка (Nil-2) та клітини курячих ембріонів (CER) [6, 8, 17, 22, 32, 38, 40, 42–50]. Вже більше 30-ти років для виробництва вакцин для людини ВООЗ та інші регуляторні органи рекомендують лише лінію клітин Vero (клітини нирки африканської зеленої мавпи) [2, 6, 8, 14, 22, 24, 30, 32, 38, 39, 40, 42, 44, 47–49, 51–53]. Для виготовлення вакцин використовують аттенуйовані штами ВС [6, 8, 14, 24, 43, 48].

Культуральні вакцини отримують шляхом зараження ВС клітинних субстратів, які культивують в моношарі або в суспензії [2, 28, 42]. Культивування клітин ВНК-21 clone 13 та Vero проводять у живильному середовищі із додаванням фетальної сироватки (ФС) великої рогатої худоби (ВРХ) при 37°C у атмосфері з 5% CO₂ [11, 17, 20, 26, 27, 29, 43, 45, 53–61]. Інфікування культури клітин проводять шляхом експозиції вірусу та моношару клітин [1, 42]. Для

репродукції та накопичення вірусу використовують ті ж самі живильні середовища, що і для клітин, із додаванням компонентів сироватки крові тварин або людини [1, 46, 47, 53, 55, 56, 62]. Заражену культуру культивують при 32–34°C та 5% CO₂ [11, 42, 46, 47, 54–55]. Живильне середовище, яке містить віріони і фрагменти клітин, центрифугують. За необхідності супернатант концентрують та очищують [2, 11, 17, 26, 28, 45, 62, 47, 55–57, 59], після чого поміщують на зберігання. Для інактивації вірусу рекомендовано використовувати бета-пропіолактон (БПЛ) [11, 25, 28, 32, 40, 41, 43, 52, 53, 57].

Сучасне серійне виробництво антирабічних препаратів потребує тривалого зберігання великих об'ємів очищених та стандартизованих суспензій промислових штамів вірусу сказу та в меншій мірі – їх ліофілізатів. Для цього в технологічні схеми виробництва введена система головного та робочого банків вірусу [27, 41, 63]. Стабільність вірусних суспензій в ході їх зберігання має важливе значення для безперервного забезпечення виробництва посівним матеріалом, проведення контролю якості антирабічних вакцин та імуноглобулінів, гарантії надійності серологічних методів діагностики [64–74]. Наявність дефектних часток у суспензії вірусу є небажаною складовою у виробництві вакцин [64, 65, 73, 75], тому що імуногенність цих препаратів залежить від активності вірусу, який використовується для її виготовлення [74]. Ліофілізовані зразки призначені для депонування промислових штамів вірусу сказу та для їх дублювання у головному банку виробництва [76]. У зв'язку з вищевикладеним набула актуальності проблема розробки ефективних методів довгострокового зберігання суспензій та ліофілізатів промислових штамів вірусу сказу в умовах виробництва антирабічних препаратів.

Головними методами зберігання більшості вірусів у дослідницьких і виробничих цілях є ліофілізація та заморожування за помірно низьких і низьких температур із застосуванням захисних середовищ [69, 72, 77–85]. Низькі температури надають стабільності віріонам і залежно від температурного режиму зберігання захищають їх від дії пошкоджувальних факторів оточуючого середовища [82, 83, 86]. Позитивні температури за необхідності можуть

використовуватись для транспортування або короткочасного зберігання, але не рекомендовані для довгострокового зберігання вірусів, тому що за цих температур більшість вірусів швидко інактивуються [87–91].

В колекціях і банках для зберігання вірусів також широко використовується ліофілізація – висушування попередньо заморожених біологічних об'єктів [65, 69, 76, 80–82, 84, 92–95]. Ліофілізовані віруси стабільні, невимогливі при тривалому зберіганні і можуть транспортуватися при температурі навколишнього середовища [65, 69, 80, 81, 92, 93, 95]. Недоліками ліофілізації є те, що цей метод дозволяє зберігати лише невеликі об'єми вірусів, для його використання необхідне спеціальне обладнання, яке зазвичай відсутнє на більшості виробництв та в лабораторіях, після зберігання і регідратації ліофілізовані віруси потрібно додатково пасувати. Терміни зберігання ліофілізованих вірусів за позитивних температур обмежені [65, 77, 92].

Зберігання за помірно низьких і низьких температур – це один з найбільш широко застосовуваних методів збереження біорізноманіття, у тому числі вірусів [68, 70, 72, 76, 80, 81, 84, 85, 95, 96, 97]. Для реалізації цього методу використовують зберігання матеріалу у морозильних камерах (між -20 та -80°C) та у рідкому азоті та його парах (від -140 до -196°C) [68–72, 76, 80, 85, 86, 95–98]. Кріоконсервування є найбільш надійним і ефективним методом довгострокового зберігання мікроорганізмів, у тому числі і вірусів. Але цей метод в даний час також не використовують в технологічних процесах виробництва вірусних препаратів. Причинами цього є необхідність у спеціалізованому кріогенному обладнанні та гарантованих поставках рідкого азоту, додаткових заходах по запобіганню інфікування оточуючого середовища і персонала, невеликі об'єми вірусних матеріалів, що зберігаються. Тому більшість досліджень присвячено впливу більш високих температур на збереженість різних штамів або видів мікроорганізмів, які мають промислове значення [65, 68, 70, 72, 80, 92, 99, 100].

Для уникнення дії пошкоджувальних факторів під час кріоконсервування та ліофілізації біологічних об'єктів використовують захисні середовища, до складу яких входять кріопротектори та/або стабілізатори [72, 80, 82, 99, 101, 102]. Ці

сполуки запобігають виникненню або зменшують вираженість дії фізико-хімічних факторів, пов'язаних із процесами кристалізації-рекристалізації та сублімації води в біологічних системах [72, 80, 103, 104]. Зазвичай середовища для транспортування, зберігання за низьких температур або ліофілізації вірусів складаються з буферних розчинів для підтримання рН, білків для стабілізації нуклеокапсидів та часто інших речовин, які підтримують оптимальну осмолярність та рН у межах від 7,0 до 8,0, або на яких віруси можуть адсорбуватися [65, 72–74, 84, 87, 92, 105–108].

Згідно з рекомендаціями ВООЗ для зберігання виробничих штамів ВС у замороженому стані бажано використовувати температури нижче -60°C [1, 11, 17, 26, 28, 29, 41, 54, 61–63, 65, 109, 110] та консервуючі середовища на основі культуральних середовищ із додаванням низьких концентрацій сироваткового альбуміну (СА) ВРХ [1, 11, 54, 65].

На сьогодні дослідження щодо зберігання за різних низьких температур та із ліофілізації ВС мають фрагментарний характер. Більшість із них присвячена короткостроковому зберіганню вірусу. Відсутні порівняльні дані щодо впливу температурних режимів, складу середовищ консервування та термінів зберігання на ВС у процесі довгострокового зберігання.

У зв'язку з вищевикладеним дослідження впливу вказаних факторів на ВС дозволило розробити технології довгострокового зберігання промислових штамів ВС за різних низьких температур і після ліофілізації в умовах виробництва антирабічних препаратів. Водночас результати проведеного дослідження доповнюють концепції щодо особливостей механізмів кріопошкоджень і кріозахисту складних вірусів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Робота була виконана в рамках відомчих науково-дослідних робіт відділу кріомікробіології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України: «Дослідження механізмів кріоушкоджень і кріозахисту іммобілізованих клітин з метою підвищення їх збереженості при кріоконсервуванні та ліофілізації» (№ державної реєстрації 0110U000404), «Розробка технологій

низькотемпературного консервування іммобілізованих клітин та біологічно активних сполук» (№ державної реєстрації 0115U000094), «Вивчення механізмів кріопшкоджень мікроорганізмів, іммобілізованих в гелевих носіях з різними фізико-хімічними властивостями, під час низькотемпературного зберігання та ліофілізації» (№ державної реєстрації 0118U001187).

Мета і завдання дослідження.

Мета роботи – дослідження впливу складу захисних середовищ, температурних режимів і термінів зберігання за низьких температур і після ліофілізації на інфекційну активність промислових штамів вірусу сказу.

Для досягнення поставленої мети передбачалося вирішити такі **завдання**:

1. Довести відсутність інактивуєчої дії різних кріопротекторних речовин на вірус сказу.

2. Провести порівняльне дослідження збереженості інфекційної активності вірусу сказу після заморожування в захисних середовищах із додаванням кріопротекторних речовин, які мають різні механізми захисної дії.

3. Дослідити збереженість інфекційної активності промислових штамів вірусу сказу після зберігання за низьких температур у захисних середовищах із додаванням різних кріопротекторних речовин. Відібрати з урахуванням отриманих результатів і технологічних регламентів кріопротекторні домішки до середовищ консервування вірусу сказу в умовах виробництва антирабічних препаратів.

4. Вивчити вплив складу захисних середовищ, температурних режимів і термінів довгострокового зберігання на збереженість інфекційної активності промислових штамів вірусу сказу.

5. Дослідити вплив складу захисних середовищ на збереженість і технологічні показники зразків вакцинного штаму вірусу сказу L. Pasteur після ліофілізації та подальшого зберігання в умовах гіпотермії та за низьких температур.

Об'єкт і предмет дослідження.

Об'єкт дослідження – вплив зберігання за різних низьких температур, ліофілізації та складу захисних середовищ на інфекційну активність промислових штамів вірусу сказу.

Предмет дослідження – інфекційна активність вірусу сказу штамів CVS та L. Pasteur після ліофілізації або заморожування у різних захисних середовищах та подальшого зберігання за різних температур.

Методи дослідження.

У роботі було використано наступні методи досліджень: кріобіологічні – ліофілізація та заморожування вірусу з подальшим зберіганням за різних температур, розморожування суспензії вірусу сказу; культуральні – культивування клітин ВНК-21 clone 13 та Vero; вірусологічні – отримання вірусу в культурах клітин, титрація вірусу в культурі клітин і визначення його інфекційної активності методом прямої флуоресценції (реакція взаємодії антигену ВС в інфікованих клітинах зі специфічними антитілами, міченими ізотіоціанатом флуоресцеїну); методи математичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів.

У дисертаційній роботі вперше показано, що на відміну від механізмів кріопошкоджень клітин пошкоджувальними факторами для ВС є «ефекти розчинів», агрегація, контакт віріонів із кристалами льоду.

Вперше виявлено відмінності у чутливості штамів CVS та L. Pasteur, які мають спільне походження, до пошкоджувальної дії заморожування та умов зберігання за низьких температур.

Вперше показано захисну дію різних кріопротекторних речовин (сахарози, гліцерину, ДМСО, желатину) на етапах заморожування до -20 , -80°C та зберігання вірусу сказу штамів CVS та L. Pasteur за цих температур. Встановлено, що вираженість захисної дії вказаних кріопротекторних речовин відносно вірусу сказу різна на етапах заморожування і змінюється під час зберігання за температур -20 , -80°C .

Вперше експериментально обґрунтовано склад захисних середовищ для довгострокового зберігання штамів вірусу сказу CVS та L. Pasteur за температур -80 та -196°C і для зберігання цих штамів до 6-ти місяців за температури -20°C . Для довгострокового зберігання за температур -80 та -196°C доцільно використовувати ростове середовище на основі DMEM із додаванням 5% сахарози, 5% гліцерину та їх суміші. Ці захисні середовища через 24 місяці (термін спостереження) зберігання за температури -80°C забезпечують збереженість 80–83% інфекційної активності штаму CVS і 71–74% штаму L. Pasteur та за температури -196°C – 94% штаму CVS і 83–87% штаму L. Pasteur. Для короткострокового зберігання при -20°C рекомендовано використовувати ростове середовище із додаванням 2,5–10% сахарози або гліцерину. Через 6 місяців за температури -20°C зберігається 80–84% інфекційної активності штаму CVS та 80–88% – штаму L. Pasteur.

Вперше показані особливості зберігання вірусу сказу штамів CVS та L. Pasteur за позитивних температур. Встановлено, що температурний режим 37°C непридатний для зберігання вірусу. Температуру 5°C можна використовувати за виробничої необхідності для нетривалого зберігання у відповідному захисному середовищі.

Вперше встановлено, що ступінь впливу температур зберігання та складу захисних середовищ на інфекційну активність ліофілізованого вірусу сказу змінюється залежно від термінів зберігання. Під час зберігання ліофілізованого вірусу протягом 24-х місяців (термін спостереження) за температур 5, -20 , -80°C через 6 місяців відмічався більший вплив складу захисних середовищ, через 12 місяців вплив обох чинників був однаковим, через 18–24 місяці визначальним чинником була температура зберігання.

Експериментально обґрунтовано склад захисного середовища для ліофілізації та подальшого зберігання вірусу сказу за температур 5, -20 , -80°C : ростове середовище на основі DMEM із додаванням суміші 1% желатину та 5% сахарози. Використання цього середовища дозволило зберегти після процесу ліофілізації 91% від вихідної інфекційної активності штаму L. Pasteur. Після

наступного зберігання протягом 24-х місяців за температур 5, –20 та –80°C збереглося 68, 80 та 87% від вихідної інфекційної активності вірусу відповідно.

Практичне значення отриманих результатів.

Розроблені протоколи довго- та короткострокового зберігання суспензій і ліофілізатів промислових штамів ВС дозволяють забезпечити на сучасних виробництвах стабільність виробничих процесів та якість антирабічних препаратів. Зокрема, в АТ «БІОЛІК» із використанням отриманих результатів створена і підтримується система головного та робочого банків промислових штамів ВС; у технологічні процеси виробництва антирабічних вакцин впроваджено методи зберігання ВС перед інактивацією; розроблено ветеринарний препарат «Антиген вірусу сказу для імунізації коней-продуцентів»; проведено валідацію та впроваджено у систему контролю методики визначення специфічної активності препарату «Імуноглобулін антирабічний (кінський)».

Особистий внесок здобувача.

Дисертаційна робота є самостійним і оригінальним науковим дослідженням. Експериментальні дослідження виконані здобувачем особисто на базі АТ «БІОЛІК» та Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Автором проаналізована сучасна вітчизняна та зарубіжна наукова література з проблеми, що досліджувалась, обґрунтовано вибір теми, проведено статистичний аналіз отриманих даних. Спільно з науковим керівником сформульовано мету і завдання дослідження, визначено методи їх вирішення, здійснено інтерпретацію, обговорення та узагальнення отриманих результатів, сформульовано висновки. Опубліковані в співавторстві наукові статті відображають концепцію роботи, підтверджують ідеї та вирішення поставлених дисертантом завдань. Допомога співавторів була спрямована на виконання окремих методичних завдань.

В опублікованих зі співавторами роботах особистий внесок здобувача полягає:

– у роботі [65] – в узагальненні наукової літератури щодо методів зберігання різних вірусів і підготовці матеріалів до друку;

– у роботах [222, 231] – у плануванні експериментів із отримання вірусу сказу у культурі клітин та тривалості його інактивації, статистичному аналізі й інтерпретації отриманих результатів;

– у роботах [220, 221, 224–226, 232–235, 246–248] – у плануванні та постановці експериментів, статистичному аналізі, обговоренні та узагальненні отриманих результатів, формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку;

– у роботах [214–216, 219] – у постановці експериментів, статистичному аналізі та інтерпретації отриманих результатів, підготовці матеріалів до друку;

– у роботах [217, 218] – у плануванні експериментів, статистичному аналізі та інтерпретації отриманих результатів, підготовці матеріалів до друку;

– у роботі [223] – у плануванні експерименту, постановці реакцій нейтралізації вірусу сказу на моделі культури клітин та урахуванні результатів із визначення титру антитіл до вірусу сказу в препараті «Імуноглобулін антирабічний (кінський)»;

– у роботі [227] – у розробці та оформленні заявки на отримання патенту на спосіб кількісного визначення антирабічного антигену *in vitro* в інактивованих антирабічних вакцинах.

Апробація результатів дисертації.

Матеріали дисертаційної роботи доповідалися і обговорювалися на наукових форумах: VIII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів, приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського «Молодь і поступ біології» (Львів, 2013); 38-, 39-, 40-, 41- та 42-й щорічній конференції молодих вчених ІПКіК НАН України «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии» (Харків, 2014–2018 рр.); 19-й Міжнародній Пущинській школі-конференції молодих вчених «Биология – наука XXI века» (Росія, Пушино, 2015); I Міжнародній конференції молодих вчених «CYS-2015» (Київ, 2015); XXIV науково-практичній конференції молодих вчених і студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 2017); 2-й Міжнародній конференції «Smart Bio» (Литва, Каунас, 2018); VII науково-практичній дистанційній конференції з міжнародною участю

«Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології» (Харків, 2018); 43-й щорічній конференції молодих вчених ІПКіК НАН України «Холод в біології та медицині – 2019» (Харків, 2019); 6-у з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Яремче, 2019); Міжнародній науково-практичній конференції «Медична наука та практика: виклики і сьогодення» (Львів, 2019); 44-й щорічній конференції молодих вчених ІПКіК НАН України «Холод в біології та медицині – 2020» (Харків, 2020).

Публікація матеріалів. Основні положення дисертації викладені у 22-х наукових роботах: 3 – у фахових наукових виданнях України (2 – входять до міжнародної наукометричної бази даних Scopus); 3 – у закордонних наукових періодичних виданнях; 1 оглядова стаття – у журналі, який входить до наукометричної бази даних Scopus, опубліковано 15 тез доповідей. Отримано патент України на корисну модель.

Об'єм і структура дисертації.

Дисертаційна робота викладена на 190 сторінках (з яких 126 сторінок основної частини) і складається з анотації, переліку умовних позначень, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, 3-х розділів власних досліджень, узагальнення та обговорення, висновків, списку використаних джерел та 3-х додатків. Список використаних джерел містить 249 найменувань, розміщених на 26 сторінках тексту. Робота проілюстрована 39 рисунками та 5 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Епізоотична ситуація щодо сказу у світі

Сказ – гострий зоонозний вірусний енцефаліт, викликаний вірусом сказу [1–11, 14, 17, 19, 29, 35, 111]. Сказ має найвищий коефіцієнт смертності серед інших інфекційних хвороб [2–5, 10, 14, 17, 28, 111]. Співвідношення випадок/летальність цього захворювання наближається до 1:1 [1–3, 8, 10, 29, 30].

Сказ зустрічається більш ніж в 150-ти країнах та територіях світу [8, 14, 18–20]. Кількість людських смертей в усьому світі внаслідок сказу, опосередкованого собаками, оцінюється в 59 000 щорічно. За оцінками, більшість смертей відбулися в Азії (59,6%) та Африці (36,4%) (рис. 1.1.1) [1–4, 8–10, 14–16, 20–30]. Головним резервуаром вірусу сказу в Азії є собака. У цьому регіоні історично і в даний час вона є причиною більшості людських випадків сказу [1, 3, 7–9, 13, 17–19, 21, 24, 25, 31, 32]. У інших географічних регіонах зі сказом пов'язані такі дикі тварини як лисиці, койоти, скунси, єноти та кажани. Оскільки вірус сказу може інфікувати всіх ссавців, він може передаватися між різними видами резервуарів і людьми за допомогою проміжних видів, які зазвичай не асоціюються зі сказом, таким як кішки. Також поширеною причиною недіагностованої інфекції є контакт з інфікованими кажанами. У таких випадках прикус або подряпина, під час яких відбувається інфікування, можуть бути настільки незначними, що залишаються непоміченими [1, 7–9, 13, 17–19, 31, 32].

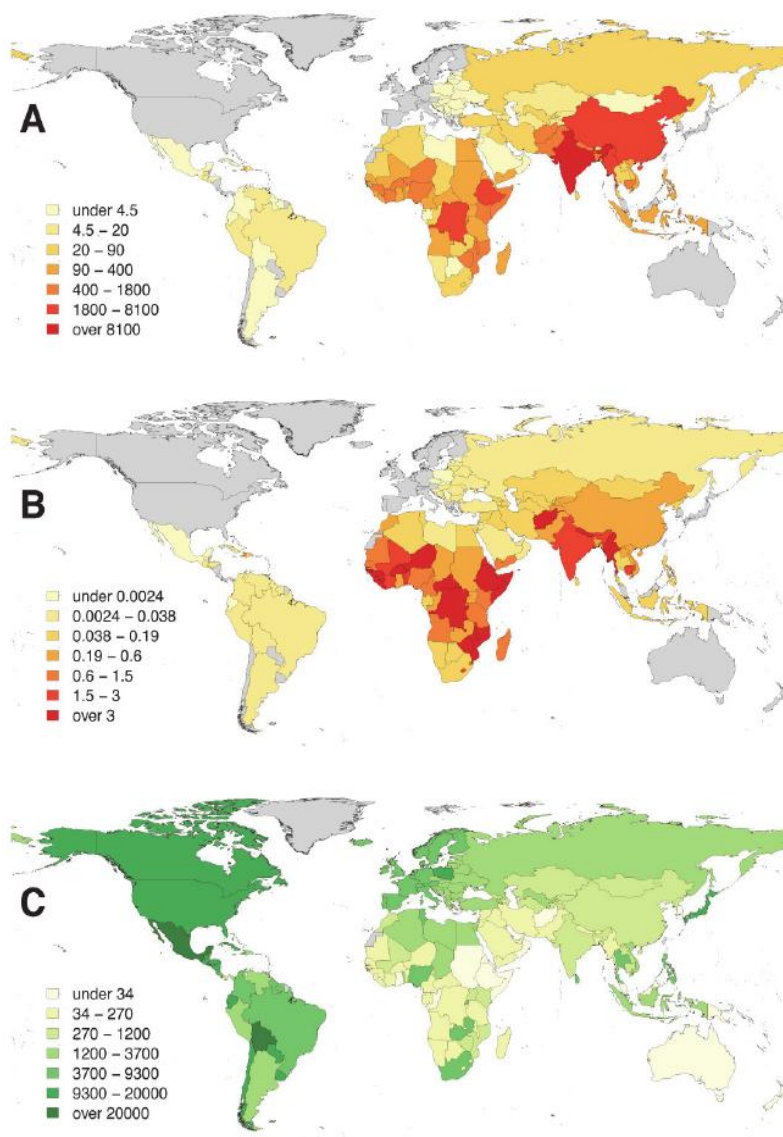


Рис. 1.1.1. Статистичні відомості щодо сказу у світі: А – смертність людей від сказу; В – коефіцієнт смертності на душу населення (на 100 000 осіб); С – витрати на вакцинацію собак (на 100 000 осіб) [21].

Примітка: країни затінені сірим кольором вільні від собачого сказу.

В Україні епідеміологічна ситуація щодо захворюваності людей на сказ є нестійкою. Україна посідає 3-є місце в Європі за поширенням сказу серед диких і домашніх тварин. Основними резервуарами в населених пунктах є собаки та кішки (міські епізоотії), в дикій природі – м'ясоїдні тварини: лисиці, вовки, єнотовидні собаки (природні епізоотії). Кожного року реєструють поодинокі випадки захворювання, зокрема, в останні роки захворіло та померло від сказу 15

людей: у 2015 р. – 6, у 2016 р. – 4, у 2017 р. – 2, у 2018 р. – 1, 2019 – 2 [33, 112, 113].

Завдяки наявності та доступності ефективної профілактики сказу у людей та контролю цього захворювання серед тваринних резервуарів за допомогою вакцинації, в деяких країнах позбулися такої великої проблеми як сказ [1, 4, 21]. Країна вважається вільною від собачого сказу, якщо не було підтверджено випадків сказу опосередкованого собаками, у людей, собак або інших видів тварин протягом щонайменше 2-х років. Сказ був ліквідований у ряді країн Західної Європи, Канаді, Сполучених Штатах Америки (США), Японії та деяких латиноамериканських країнах [2, 9, 15, 31, 114]. Австралія та багато тихоокеанських острівних держав завжди були вільні від сказу, опосередкованого собаками. Однак це захворювання все ще поширене в більш ніж 100 країнах і територіях, переважно в країнах, що розвиваються. Загальна економічна вартість сказу, опосередкованого собаками, оцінюється у 8,6 млрд. дол. США. Основні витрати, пов'язані зі сказом залежать від регіону і включають втрату працездатності внаслідок передчасної смерті (55% загальних витрат), витрати на профілактику (20%) і прямі витрати на медичну галузь і постраждалих від укусів (20%) [2, 109]. У зв'язку з досить складною епізоотичною ситуацією щодо сказу в Україні в останні роки проводять заходи з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин відповідно до рішень Державної надзвичайної протиепізоотичної комісії при Кабінеті Міністрів України. Проведення цих заходів потребує збільшення об'ємів виробництва вітчизняних вакцинних препаратів [112].

1.2. Характеристика збудника сказу

Збудником сказу є вірус (*Rabies virus*), який відноситься до порядку *Mononegavirales*, родини *Rhabdoviridae* із роду *Lyssavirus* [1–11, 13, 15, 16, 23, 24, 30, 31, 49, 60, 111, 115–117]. На даний час Міжнародний комітет з таксономії вірусів визнає 16 видів роду *Lyssavirus* [2, 3, 8, 9, 14, 17, 116, 117]. Рід поділяється на дві філогрупи на основі генетичних відстаней та серологічної крос-реактивності. Вірус сказу (ВС) відносять до філогрупи I [2, 9].

Віріон має форму кулі довжиною 130–250 нм і діаметром 60–100 нм (рис. 1.2.1) [1, 2, 4, 5, 8, 10, 13–15, 17, 111, 118]. Генوم вірусу представлено несеgmentованою одноланцюговою РНК негативної полярності, довжиною 12 кб [1–5, 10, 13–15, 17, 23, 24, 48, 60, 111, 115, 118]. РНК вірусу кодує п'ять вірусних білків: нуклеопротеїн (N), який щільно інкапсулює геном; фосфопротеїн (P), матричний білок (M), поширений по поверхні вірусу трансмембранний глікопротеїн (G), що являє собою первинну мішень для нейтралізуючих антитіл, і РНК-залежну РНК-полімеразу (L) [1–5, 7, 10, 13, 15, 17, 23, 24, 48, 60, 111, 118]. Вірусна частка складається з двох структурних і функціональних одиниць: внутрішнього спірального нуклеокапсиду і зовнішньої оболонки [2, 4, 13, 17]. Нуклеокапсид складається з рибонуклеопротеїнового комплексу (РНП), що включає геномну РНК і щільно зв'язаний білок N та білки L і P [2–4, 10, 13, 15, 17, 24, 118, 111]. Матричний білок (M) та трансмембранний глікопротеїн (G) формують зовнішню оболонку віріону [118, 13, 10, 17], яка частково складається з цитоплазматичної мембрани (ЦПМ) клітини-господаря та формується під час брунькування [2, 4, 10]. G-білок є фактором патогенності вірусу і індукуює появу віруснейтралізуючих антитіл (ВНА), які є основними імунними ефекторами у захисті від інфекції. РНП індукуює клітинний імунітет, необхідний для збільшення кількості ВНА, а також для встановлення імунологічної пам'яті і забезпечення тривалості імунітету [2–4, 13, 15, 48]. Шипи G-білка виступають через мембрану віріонів і складаються з трьох глікозилізованих ектодоменів, які зв'язують віріони з рецепторами клітин-господарів. M-білок утворює олігомери, які зв'язуються з нуклеокапсидом, надаючи жорсткість структурі віріону [2, 13].

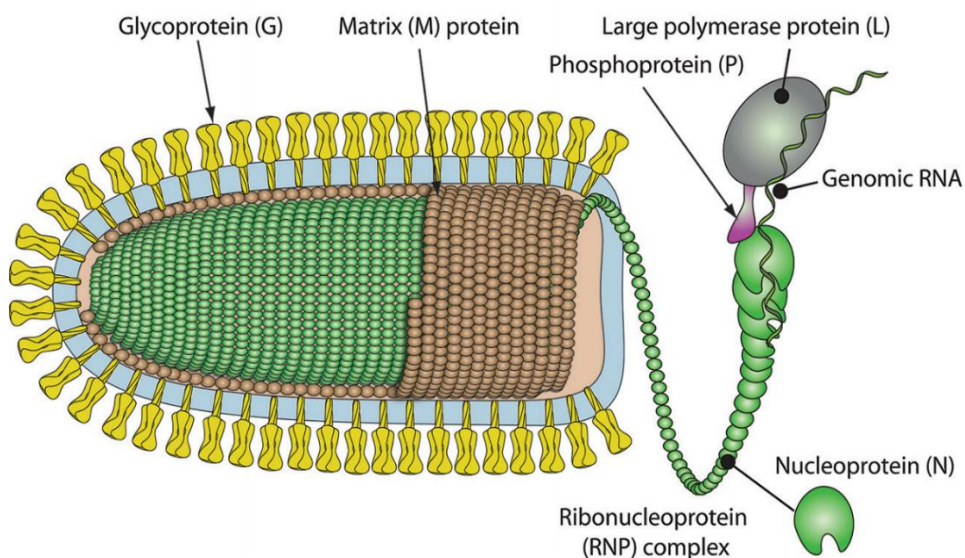


Рис. 1.2.1. Схема будови ВС [118].

Після закріплення на клітині віріон сказу проникає в неї за допомогою ендоцитозу. Потім вірусна мембрана зливається з лізосомальною вакуолею, вивільняючи у цитоплазму нуклеокапсид, який сприяє розмноженню вірусу в цитоплазмі клітин господаря [7, 13, 15].

1.3. Патогенез сказу

ВС надходить у організм, як правило, через інфільтрацію зараженої вірусом слини скаженої тварини в рану після укусу або через контакт подряпини, відкритої рани і слизової оболонки з джерелом ВС, наприклад, інфікованою слиною або тканинами ЦНС від скаженої тварини [2–4, 12, 9, 13–17]. Через інтактну шкіру вірус в організм не проникає [2, 4, 12, 17]. Потім цей нейротропний вірус через нервово-м'язові з'єднання потрапляє до периферичних нервів і використовує ретроградний аксонний транспорт для досягнення ЦНС [2, 3, 5, 7, 9, 15–17, 111]. Після поширення в ЦНС, вірус рухається відцентровим шляхом назад по нервах до різних органів. Це призводить до інфікування м'язових веретен, шкіри, волосяних фолікулів та інших не нервових тканин, таких як, серцевий м'яз, легені, органи черевної порожнини та слинні залози, де викидається в слину. Від інфікованої тварини вірус передається наступній жертві зазвичай через укуси [2, 3, 5, 9, 13, 15, 17]. Вірус також може проникати в моторні аксони безпосередньо під час проникаючої травми [2].

Інкубаційний період сказу варіює від 5-ти днів до декількох років (зазвичай 2–3 місяці; рідше більше 1 року), залежно від кількості вірусу в інокуляті та близькості рани до центральної нервової системи [1, 2, 4, 15, 17]. Тому до найвищої смертності від сказу призводять укуси інфікованою твариною на голові і обличчі [1]. Класично клінічні ознаки захворювання можна розділити на п'ять стадій, включаючи інкубаційний або безсимптомний період, продромальний період, гостру неврологічну фазу, кому та смерть [5, 7, 9]. У випадку укусу часто продромальний період триває від 2-х до 10-ти днів [1], першим специфічним клінічним симптомом у такому випадку є невропатичний біль на місці укусу, свербіння, печіння, оніміння або парестезія навколо ураженої ділянки [1, 2, 7, 15, 17]. Це викликано запаленням у місцевих тканинах, індукованим клітинним імунітетом [1]. Початкова клінічна картина сказу у людей і тварин може бути досить непримітною і неспецифічною [4]. Первинні неспецифічні симптоми сказу можуть включати загальне нездужання, озноб, лихоманку, головний біль, світлобоязнь, анорексію, біль у горлі, кашель і біль опорно-рухового апарату [1]. Далі слідує гостра неврологічна фаза, в якій пацієнти виявляють ознаки неврологічної дисфункції широкого спектру, такі як тривога, збудження, параліч або епізоди делірію [1, 2, 4, 7, 15], які не обов'язково корелюють зі специфічною анатомічною локалізацією ВС в центральній нервовій системі [2]. Різні пропорції хворих проявляють класичну патогномонічну ознаку сказу – гідрофобію [1, 4, 15, 17]. Також клінічними ознаками можуть бути аерофобія, дисфагія, слабкість, нудота або блювання [2, 4]. Розвиток хвороби може відрізнятися, але зазвичай проходить через кому, яка обумовлена функціональним пошкодженням нейронів, до смерті через серцеву або дихальну недостатність приблизно через 30-60 днів після інфікування [1, 2, 4, 7]. Більшість випадків сказу проявляються як енцефалітна (буйна) форма, і менше 20% випадків спостерігаються як паралітична форма [4, 5, 7, 9, 15]. Також може бути атипова форма хвороби [2]. Це може пояснюватись атиповими варіантами вірусу, імунною відповіддю господаря або великими дозами інокульованого вірусу (як у випадку трансплантації органів від

донорів, інфікованих сказом). Без інтенсивної терапії смерть у такому випадку настає протягом 7–10 днів після появи клінічних симптомів [2, 17].

1.4. Діагностика сказу

На даний час не існує методів діагностики сказу до початку клінічних проявів захворювання. У людини про зараження сказом можуть свідчити ознаки гідрофобії чи аерофобії, якщо вони є [5, 10]. Клінічна діагностика сказу дуже ускладнена і залишається важкою та в ряді випадків недостовірною. Тому, коли це можливо, для підтвердження діагнозу необхідна лабораторна діагностика [2, 5].

Раніше процедура посмертної діагностики сказу полягала у використанні відповідного барвника для гістопатологічного дослідження тканин головного мозку на наявність внутрішньоклітинних цитоплазматичних включень – частинок нуклеокапсиду ВС, які називаються тільцями Негрі [1, 4, 10, 15, 17, 119]. Однак, тільця Негрі не завжди присутні в мозковій тканині, інфікованій ВС, або вони можуть бути сплутані з іншими внутрішньоклітинними включеннями. Тому у більшості лабораторій гістопатологічні методи були замінені більш досконалыми сучасними методами [1, 4, 10, 17].

Посмертна діагностика у тварин з підозрою на сказ заснована на методах виявлення вірусних антигенів за допомогою стандартного методу флуоресцентних антитіл (fluorescent antibody test – FAT), імуноферментного аналізу (ІФА), прямого швидкого імуногістохімічного тесту (direct rapid immunohistochemistry test – DRIT) та швидкого імунодіагностичного тесту (rapid immunodiagnostic test – RIDT), або методу вірусної ізоляції з використанням культури клітин чи інтрацеребральної інокуляції мишам [1, 2, 4, 5, 7, 10, 11, 15, 17, 19, 42, 60, 119–121].

Посмертна діагностика у людини може бути проведена шляхом застосування тих самих методик з використанням зразків біоптатів мозку. Однак, коли біопсія мозку неможлива, альтернативою для діагностики сказу є виявлення вірусної РНК у зразках біоптатів шкіри. За допомогою засобів молекулярної

діагностики, включаючи полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР), ПЛР у реальному часі та інші методи виявлення РНК лісавірусу, можлива діагностика сказу у живих пацієнтів. Зразки, придатні для таких аналізів, включають слину, спинномозкову рідину, зразки біопсії шкіри потилиці з волосяними фолікулами, вилучені волосяні фолікули, слъози та сечу [1, 2, 4, 5, 7, 10, 11, 15, 17, 19, 121]. Вірусні антигени в таких зразках можуть бути виявлені також за допомогою FAT [1, 2, 4, 119, 5].

В ході прижиттєвої діагностики невакцинованих пацієнтів також використовують методи визначення віруснейтралізуючих антитіл в сироватці крові і у спинномозковій рідині. Вони можуть бути визначені за допомогою тестів нейтралізації вірусу у культурі клітин, таких як експрес-тест фокус-флуоресцентного інгібування (rapid fluorescent focus inhibition test – RFFIT) і тест нейтралізації вірусу флуоресцентними антитілами (fluorescent antibody virus neutralization – FAVN). Окрім цього титри антитіл проти вірусного білку G, виміряні за допомогою ІФА, добре корелюють з тими, що вимірюються за допомогою методів нейтралізації вірусу у культурі клітин [2, 4, 5, 11, 15, 17]. Однак, враховуючи патогенез вірусу, практичне значення серологічних тестів в прижиттєвій діагностиці сказу у людей є невеликим, оскільки антитіла до ВС можуть бути присутніми в сироватці та спинномозковій рідині тільки під час пізньої стадії інфекції людини [2].

1.5. Профілактика сказу

Після клінічних проявів сказу невеликовий, але захворювання можна попередити за допомогою передекспозиційної (ПрЕП) або постекспозиційної профілактики (ПЕП), під час яких застосовуються антирабічні вакцини та імуноглобуліни (RIG) [1, 2, 4, 6–8, 10, 14, 15, 17, 24, 25, 28, 31, 35, 111].

Вакцина сприяє появі імунної відповіді, стимулюючи утворення антитіл, які опосередковують інактивацію вірусу, який вже був введений в тканину під час укусу сказженою твариною або який може потрапити в організм [8, 34, 35]. Антирабічні імуноглобуліни використовують для пасивної імунізації як складову

специфічної профілактики сказу у інфікованої людини після укусу скаженою твариною [2, 7, 8, 10, 35]. Склад антирабічних вакцин та імуноглобулінів повинен відповідати рекомендаціям ВООЗ щодо виробництва та контролю цих препаратів [2].

В ході ПрЕП застосовують антирабічні вакцини, активність яких повинна бути не менше 2,5 міжнародних одиниць на мл (МО/мл). Цей вид специфічної профілактики рекомендується для людей з високим ризиком інфікування через їх професійну або іншу діяльність і, у особливих випадках – під час їх проживання у віддаленому районі [2, 5, 7, 10, 12, 14, 15, 35]. ПрЕП рекомендується також для людей, які подорожують у віддалені райони, де неможливо гарантувати своєчасний доступ до адекватної ПЕП або якщо особа має високий ризик контакту з дикими тваринами, зокрема ПрЕП усуває необхідність введення RIG після укусу скаженої тварини [2, 5, 7, 10, 15].

Натомість ПЕП застосовується вже після контакту з ВС (після укусу скаженою або підозрілою на сказ твариною) і полягає у швидкому застосуванні антирабічної вакцини (активна імунізація) з первинною обробкою рани та одночасно з пасивною імунізацією шляхом введення RIG, якщо це передбачено категорією контакту [1, 3–5, 7, 10, 12, 14, 15, 17, 34, 35, 122]. Слід зазначити, що ПЕП є майже на 100% ефективною мірою запобігання розвитку клінічного сказу за умови введення в перші дні після імовірного зараження, але неефективною після прояву клінічних ознак сказу [1, 2].

Рішення про введення лише вакцини або вакцини та RIG залежить від категорії потенційного інфікування [1–3, 5, 7, 10, 14, 35].

На даний момент для запобігання сказу найбільш безпечними і ефективними вважаються концентровані, очищені антирабічні вакцини на основі культури клітин і курячих ембріонів, які виробляються і використовуються вже більше чотирьох десятиліть. Їх призначають як для ПрЕП, так і для ПЕП, і вводять мільйонам людей у всьому світі. Швидке введення таких вакцин після експозиції з ВС, у поєднанні з первинною обробкою рани та одночасним

введенням антирабічних імуноглобулінів, якщо це показано, майже завжди ефективно у запобіганні сказу, навіть у разі високого ризику зараження [2, 3, 122].

Оскільки більше 95% випадків сказу людини були викликані взаємодією з собаками, запобігти розповсюдженню сказу можна шляхом контролю над природними резервуарами вірусу, а саме – шляхом контрольованої вакцинації собак [1, 2, 18, 36]. Також важливою стратегією у санації країн від сказу є контроль популяцій диких м'ясоїдних тварин та їх оральна вакцинація з використанням приманок [2, 10].

1.6. Антирабічні вакцини та імуноглобуліни

Сказ займає чільне місце в історії розробки вакцин, оскільки це було третім захворюванням, для запобігання якого було використано вакцину [6, 36]. Першу антирабічну вакцину розробили Луї Пастер і Еміль Ру ще у 1880-х роках [5, 6, 8, 15, 24, 31, 32, 34, 37–41]. Тривалий період інкубації між інфікуванням та розвитком перших клінічних ознак сказу у людей привів Луї Пастера до припущення, що вірус потребує часу для поширення від місця інокуляції до головного мозку, і що вакцинація протягом цього періоду може захистити від захворювання [1, 36]. Вакцина була виготовлена з ВС, який отримали шляхом серії пасажів через мозок кроликів. Таким чином був отриманий фіксований штам ВС, який мав постійний час інкубації (7 діб). В якості засобу «ослаблення» вірусу використовували висушування. Ця вакцина була вперше застосована у 1885-му році на маленькому хлопчику, який був покусаний скаженою собакою, і виявилася ефективною [5, 6, 36, 37]. Вивчення та застосування Луї Пастером основних принципів дії антирабічних препаратів є фундаментом для застосування профілактичних заходів в разі підозри інфікування ВС і в наш час [1, 36].

Удосконалення методів Пастера продовжували наступні два десятиліття. У 1908 році Фермі розробив аттенуйовану вакцину проти сказу з мозку овець та кіз, яка містила ослаблений вірус [6]. У 1911-му році Девід Семпл в Індії розробив антирабічну вакцину, вироблену з тканини мозку дорослих овець, яка була інактивована фенолом і не містила живого вірусу. У 1955-му році лікарі

Фуенсаліда та Паласіос у Латинській Америці почали виробляти вакцину проти сказу із тканин мозку мишей, намагаючись уникнути неврологічних побічних ефектів, пов'язаних з мієліном із тканин мозку дорослих тварин, що присутній у вакцинах Семпла. Хоча кількість мієліну було зменшено, все ще повідомлялося про побічні ефекти від його залишків і в цій вакцині [6, 24, 36]. У зв'язку з великою кількістю небажаних побічних реакцій у людей після введення вакцин, отриманих із мозку тварин, вже з 1983-го року ВООЗ не рекомендує використовувати такі вакцини [5, 36].

Знання того, що ВС може інфікувати більшість органів, в яких часто здатний ефективно розмножуватися, наштотхнули дослідників на те, що ВС можна культивувати в самих різних клітинах [42]. Поява технології первинних культур клітин в 40-х роках ХХ століття та її використання для культивування вірусів призвело до значних успіхів у розвитку створення вірусних вакцин, забезпечуючи їхню безпечність та високу ефективність [22, 36, 42, 51, 52].

Сприйнятливість різних первинних культур клітин нирок (миші, хом'яків, свиней, собак та мавп) та фібробластів пташиних ембріонів до зараження ВС показала, що ці клітини потенційно можуть бути використаними для виробництва антирабічної вакцини [8, 24, 42, 52]. Первинні культури клітин успішно використовувались в багатьох країнах та використовуються навіть зараз для виробництва антирабічних вакцин [24, 52]. Першою зареєстрованою культуральною вакциною проти сказу була вакцина, отримана у первинній культурі клітин нирок хом'яка (1958-й рік). Але і її ефективність, і застосування були обмеженими [6]. Очищена антирабічна вакцина, отримана із використанням клітин ембріонів курчат, вперше була зареєстрована у 1984-му році у Європі та у 1997-му році у США [6, 24, 36]

Отримання вакцини з використанням людської диплоїдної клітинної лінії (WI-38) вперше було описано у 1964-му році. З того часу для отримання ВС були розроблені інші штами диплоїдних клітин людини, такі як ембріональні клітини легень (HEL та MRC-5) [6, 14, 24, 32, 36, 42, 44]. Ця вакцина отримала широке визнання та стала стандартом, з яким порівнювали усі інші антирабічні вакцини,

виготовлені за допомогою культивування ВС у культурі клітин. Але основним недоліком такої вакцини є її відносно висока вартість порівняно з іншими вакцинами клітинного походження, що є частково пов'язаним із труднощами культивування диплоїдних клітин, та невисока імуногенна активність вірусу, отриманого у цих клітинах [52, 36].

Згодом первинні та диплоїдні клітинні культури почали замінювати постійними клітинними лініями, використання яких призвело до розробки нового покоління вакцин проти сказу [43]. Постійні клітинні лінії набули все більшого визнання з боку регуляторних органів, оскільки вони не втрачають здатність ділитися через декілька пасажів, як первинні, а поліпшені технології контролю якості цих клітин усувають побоювання щодо їх потенційних небажаних властивостей [51, 22, 36, 6, 14].

Зараз існує ряд постійних клітинних ліній, які використовують для накопичення ВС в ході виготовлення ветеринарних вакцин: клітини нирки новонародженого сірійського хом'яка, лінія 21 (ВНК-21), фібробласти нирок хом'яка (Nil-2) та клітини курячих ембріонів (CER) [6, 8, 17, 22, 32, 38, 40, 42–50]. Але через гетероплоїдні характеристики та імовірний канцерогенний потенціал цих клітинних ліній вони не можуть використовуватись у практичній медицині. Вже більше 30-ти років для виробництва вакцин для людини ВООЗ та інші регуляторні органи рекомендують лише лінію клітин Vero (клітини нирки африканської зеленої мавпи), яка була отримана у 1962-му році [2, 6, 8, 14, 22, 24, 30, 32, 38–40, 42, 44, 47–49, 51–53]. А вже у 1985-му році у Франції була зареєстрована перша антирабічна вакцина, виготовлена із використанням цієї культури клітин [36].

Для виготовлення вакцин використовують аттенуйовані штами ВС. Загалом існує три історичні вакцинні штами ВС, адаптовані до культивування як *in vivo*, так і *in vitro*, які стали основними кандидатами для виробництва вакцин проти сказу людини: вірус Луї Пастера (PV), Flury, SAD та їх похідні [6, 8, 14, 24, 43, 48].

Для проведення серологічних випробувань по визначенню кількості вірус-нейтралізуючих антитіл до ВС *in vivo* та *in vitro* рекомендовано використовувати фіксований стандартний штам вірусу сказу CVS (Challenge virus standard) [1, 15]. Цей штам походить від штаму PV [43]. Адаптація ВС штаму CVS до росту в культурі клітин була проведена в 1958 році [62]. Цей лабораторний штам легко інфікує клітини ВНК (ВНК-21 clone 13) і може реплікуватися в них до високих титрів. Клітини ВНК широко використовують для отримання ВС в лабораторіях [1, 62].

1.7. Технологія виготовлення антирабічних вакцин із використанням культур клітин

Культуральні вакцини отримують шляхом зараження ВС клітинних культур [2, 42, 28], які культивують в моношарі або в суспензії. Для деяких типів клітин потрібне спеціалізоване середовище, але в більшості технологій середовище для розмноження базується на сольовому розчині Ерла, доповненому амінокислотами та вітамінами [42]. Культивування клітин ВНК-21 clone 13 та Vero проводять у звичайному живильному середовищі Ігла або середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко (Dulbecco's modified Eagle's medium – DMEM), із додаванням 10% ФС ВРХ при 37°C у атмосфері з 5% CO₂ [11, 17, 20, 26, 27, 29, 43, 45, 53–61].

Інфікування культури клітин проводять шляхом внесення вірусу у 1-3-добовий моношар клітин або в ході пересіву клітинної культури [1, 42, 46]. Експозицію клітин з вірусом проводять протягом години при 32–37°C [1, 11, 42]. Для внутрішньоклітинного розмноження і накопичення вірусу використовують ті ж самі живильні середовища, що і для клітин, із додаванням до 10% ФС ВРХ, або 0,1–0,3% СА ВРХ [1, 62, 53, 55, 56], або 0,2–0,5% СА людини [46, 47]. Додавання компонентів сироватки захищає вірус від термічної інактивації вірусу, а не забезпечує необхідні інгредієнти для реплікації вірусу [42]. Заражену культуру інкубують протягом 48–96 год при 32–34°C та 5% CO₂ [11, 42, 46, 47, 54–57]. Накопичення ВС в клітинних культурах не супроводжує жоден чітко визначений цитопатичний ефект. Наприклад, у клітинному моношарі лінії ВНК-21 інфіковані

клітини починають старіти та швидше відшаровуватися від поверхні, ніж незаражені контрольні клітини [42, 46]. Тому супернатант, що містить віруси, можна збирати декілька разів [1, 45].

Культуральне середовище центрифугують 10–15 хвилин при 800–4000 g у рефрижераторній центрифугі при 4°C. За необхідності, супернатант концентрують та очищують [2, 11, 17, 26, 28, 45, 47, 55–57, 59, 62], після чого поміщають на зберігання. Для інактивації вірусу рекомендовано використовувати бета-пропіолактон (БПЛ) у кінцевій концентрації від 1:3500 до 1:5000 при 2–8°C [11, 25, 28, 32, 40, 41, 43, 52, 53, 57].

Технологічна схема виробництва антирабічних препаратів потребує тривалого зберігання великих об'ємів промислових штамів вірусів у вигляді суспензії та наявності системи банків з ефективними методами зберігання [63, 41, 27, 123].

Наявність великих об'ємів очищених та стандартизованих суспензій промислових штамів ВС безперервно забезпечує виробництво посівним матеріалом, проведення контролю якості антирабічних вакцин та імуноглобулінів, гарантує надійність серологічних методів дослідження [64–74]. Ліофілізовані зразки призначені для депонування штамів ВС та їх дублювання у головному банку виробництва [76].

1.8. Актуальність розробки методів довгострокового зберігання та створення колекцій банків вірусів

Для дослідження ультраструктури вірусів, механізмів їх реплікації та зміни геному, епідеміологічного моніторингу вірусних інфекцій, вивчення патогенезу вірусних захворювань, розробки засобів профілактики та етіотропного лікування, генно-інженерних досліджень, збереження різних видів і штамів вірусів як складової біорізноманіття та для гарантованого забезпечення біотехнологічних виробництв промисловими штамми вірусів у світі створена мережа колекцій та виробничих банків вірусів [65–67, 69–72, 76, 83–86, 95, 99, 123–125, 127–129]. Вимоги до колекцій та банків змінюються з появою нових технологій, але

основною вимогою є ефективне зберігання, яке полягає у підтриманні вірусів у стабільному стані протягом довгого періоду [64–72, 84, 123]. Пріоритетним завданням дослідників, які працюють в цьому напрямку, є розробка надійних протоколів довгострокового зберігання вірусів, застосовуючи фундаментальні теоретичні та практичні основи кріобіології, з належним урахуванням особливостей ультраструктури вірусів із різних сімейств та регламентів виробництв і вимог до препаратів на основі вірусів [86]. Стабільність зразків вірусів, які зберігають в колекціях та банках, має важливе значення для розробки і виробництва вакцин, специфічних імуноглобулінів, діагностикумів для молекулярно-біологічних і серологічних методів діагностики [64–74]. Наявність дефектних часток у суспензії вірусу є небажаною складовою у виробництві вакцин [64, 65, 73, 75]. Крім того, наявність різної кількості дефектних вірусних часток та інактивованого вірусу впливає на надійність та відтворюваність тестів на основі нейтралізації вірусів. Це пов'язано з тим, що вірусні частки, які втратили інфекційну активність, конкурують з повноцінними інфекційними віріонами за зв'язування антитіл. Крім того, ці дефектні частки інгібують реплікацію інфекційних вірусних часток [64, 65, 75].

Дослідження по довгостроковому зберіганню вірусів виконані на різних за своєю будовою вірусах. Вони містять різні, в ряді випадків суперечливі дані щодо ефективності технологій та режимів консервування, складу захисних середовищ. Аналіз наукових та технологічних джерел свідчить про те, що найбільш поширеними методами довгострокового зберігання вірусів є зберігання за різних низьких температур та ліофілізація [69, 72, 77–85]. Під час використання низьких температур відслідковується залежність збереженості вірусів із різною будовою від температурних режимів зберігання [65, 74, 76, 105, 130]. Прості віруси частіше зберігають за помірних низьких температур без підбору індивідуальних режимів охолодження і захисних середовищ. Це, найбільш імовірно, пов'язано із простою будовою віріонів і, як наслідок, – відсутністю мішеней для дії пошкоджувальних факторів низьких температур [71, 92, 99, 130].

Складні віруси зберігають за низьких температур з використанням експериментально обґрунтованих режимів охолодження та складу захисних середовищ. Це пов'язано із наявністю у складі таких вірусів ліпідної оболонки, ферментів та більшої кількості води [71, 74, 77, 92, 99, 105].

1.8.1. Зберігання вірусів за позитивних та різних низьких температур

Вивчення збереженості вірусів за низьких температур та після ліофілізації має не тільки прикладне значення як етап біотехнологічних виробництв, а й доповнює фундаментальні дослідження із фаху кріобіології. Це пов'язано із особливостями будови вірусів, зокрема вірусу сказу. Ультраструктуру вірусу сказу представлено у розділі 1.2.

В історичному екскурсі механізми кріопошкоджень біологічних об'єктів були вивчені на різних клітинах еукаріотів та прокаріот. Були сформульовано наступні теоретичні узагальнення та концепції механізмів кріопошкоджень клітин.

Механічні пошкодження. Вперше можливість таких пошкоджень показав ще на початку ХХ століття М.О. Максимов [131, 132]. Було показано можливість механічного пошкодження клітин зростаючими поза- та внутрішньоклітинними кристалами льоду та під дією термодинамічних напруг, які розвиваються внаслідок формування температурних градієнтів в центральній та периферійних зонах контейнерів для заморожування біоб'єктів.

Ефекти розчинів. Вони виникають під дією на клітини високих концентрацій різноманітних речовин, які виникають в результаті виморожування води під час формування позаклітинного льоду. Головним локусом кріопошкоджень внаслідок дії ефектів розчинів (колоїдно-осмотичний лізіс, ліотропний та хаотропний ефекти) є ЦПМ [133].

Теорія мінімального об'єму клітин Г.Т. Мерімена [134–136]. Коли в процесі позаклітинного кристалоутворення клітини зміщуються в каналці з гіперконцентрованими розчинами солей, частина води виходить із клітин в результаті осмотичного ефекту. Об'єм клітин зменшується до критичного

мінімуму. При такому об'ємі бар'єрні властивості ЦПМ різко падають. На етапі заморожування ЦПМ стає проникливою для гіперконцентрованих позаклітинних розчинів. На етапі відігріву в клітини поступає велика кількість води. Клітини набухають, ЦПМ розтягуються з утворенням макропор та пошкоджених ділянок.

Гіпотеза «мембранного пошкодження» П.Д. Квін [137]. На етапі охолодження рідкокристалічна фаза в різних ділянках бішару ЦПМ перетворюється на гелеподібну. В цих ділянках між твердою і рідкою фазами утворюються мікродфекти з порушеннями транспортної і бар'єрної функцій мембрани. Через ці мікродфекти відбувається витік метаболітів.

Пошкоджувальна дія рН [138, 139]. Клітини і позаклітинне середовище містять сполуки, які є компонентами буферних систем. Під час позаклітинного кристалоутворення відбувається евтектична кристалізація цих компонентів. В розчинах NaCl, що містять компоненти буферних систем, під час евтектичної кристалізації показники рН оточуючого середовища зміщуються у бік кислого середовища. Це викликає протонування функціональних груп амінокислотних залишків, зміну структур білків і їх денатурацію.

Електростатичні ефекти [140]. На межі розділу кристалів льоду і розчинів електролітів в результаті захвату льодом іонів із різними знаками утворюється подвійний електричний шар з вираженим електричним потенціалом. Цей потенціал викликає пробій ЦПМ.

Сульфгідрильна гіпотеза Дж. Левіта [141]. На етапі заморожування окислюються -SH-групи білків, що призводить до утворення дисульфідних ковалентних -S-S- зв'язків. Ці зв'язки призводять до оборотної денатурації білків в ЦПМ і послідуєчих порушень проникливості ЦПМ.

Двофакторна теорія кріопошкоджень П. Мейзура [86, 142–145]. Для різних за походженням і будовою клітин існують оптимальні швидкості охолодження, при яких кріопошкодження клітин мінімальні. При швидкостях охолодження, менших за оптимальну, клітини зазнають дії таких пошкоджувальних факторів як високі концентрації електролітів, висока осмолярність, ефекти розчинів, зміни рН

та ін.. При швидкостях охолодження, вищих за оптимальну, на клітини діють фактори, пов'язані із внутрішньоклітинною кристалізацією.

Мультифакторна теорія кріопшкоджень Л.К. Лозини-Лозинського і Д. Прайбора [146, 147]. Згідно цієї теорії на біологічні об'єкти в процесі кріоконсервування впливає багато пошкоджувальних факторів, вираженість яких може змінюватись залежно від режимів охолодження-відігріву, складу консервуючих середовищ, бар'єрних властивостей мембран, переохолодження, температури зберігання та ін..

Виходячи із наведеного вище аналізу можна стверджувати, що заплановані дослідження впливу зберігання за низьких температур і ліофілізації на вірус сказу дозволять доповнити існуючі положення новими даними щодо механізмів кріопшкоджень біологічних об'єктів, у яких відсутні мембрани, цитоплазма, енергетичні системи, розвинена сітка взаємодії різних ферментів [74].

На даний час цільові фундаментальні дослідження механізмів кріопшкоджень і кріозахисту вірусів не проводили. В доступних нам наукових та технічних джерелах містяться окремі фрагменти безпосередньо кріобіологічних досліджень, які дали змогу авторам зберігати певний час різні віруси. При цьому автори *a priori* використовували багатокомпонентні за своїм складом захисні середовища, що зменшувало інформативність отриманих результатів щодо впливу режимів охолодження і температур зберігання на інфекційну активність вірусів та дозволяло в більшості досліджень досягти максимальних результатів збереженості вірусів.

Температурні режими зберігання вірусів також були обрані залежно від наявності холодильних камер та кріогенного обладнання, які використовують на біотехнологічних виробництвах і у вірусологічних лабораторіях. Найчастіше використовували зберігання в умовах гіпотермії [100, 148–150], при температурах -20°C , від -60 до -85°C , в парах азоту, в рідкому азоті [65, 68–72, 76, 77, 80, 85–87, 92, 95–100, 105, 129, 130, 149, 151–153].

Позитивні температури за необхідності можуть використовуватись для транспортування або короткочасного зберігання, але не рекомендовані для

довгострокового зберігання вірусів [87–91]. Так, навіть після двогодинної інкубації при 37°C інфекційна активність бакуловірусу знижувалася більш ніж на 75% від початкового значення, хоча при 0°C інактивацію вірусу не спостерігали протягом 24-х годин. При цьому інактивація у культуральному середовищі була меншою, ніж у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ), ймовірно, через захисний вплив сполук, що містяться в культуральному середовищі [154]. В досліджах, проведених також із бакуловірусом, було показано вплив складу захисного середовища на збереженість віріонів під час зберігання при 4°C. За цієї температури зберігали неконцентровані і концентровані зразки бакуловірусу. Для концентрування використовували ультрафільтрацію та хроматографію, під час яких із середовища були вилучені білки. Було показано, що неконцентрований вірус, який зберігали при 4°C в культуральному середовищі, втратив свою інфекційну активність через 100 діб. Концентрований вірус, який зберігали в культуральному середовищі без білків, зберігав інфекційну активність 50 діб [100]. Було зроблено припущення, що білки, які містяться у ростовому середовищі, стабілізують суперкапсид віріонів. Стабілізацію суперкапсида віріонів білками ростового середовища і, відповідно, підвищення їх резистентності до пошкоджувальної дії фізико-хімічних факторів, встановлено і в ході ліофілізації, і під час зберігання в замороженому стані [65, 91, 100].

Вакцинні штами вірусу грипу А і В не втратили свою активність після зберігання протягом року за температур від 2 до 8°C. Найвищі результати збереженості були в зразках із захисним середовищем на основі сахарозо-фосфатно-глутаматного буфера (sucrose phosphate glutamate buffer – SPG buffer) із додаванням 1% аргініну та 0,5% рекомбінантного СА людини [148].

Дослідження стабільності вірусу поліомієліту, який зберігали при –20, 4–8, 22 та 36°C у 1 М розчині хлориду магнію протягом 7, 14 та 21 дня, показали невеликі втрати інфекційного титру вірусу при температурі –20 і 4–8°C протягом 21 дня. А за температури 36°C протягом 21 дня сталася майже повна втрата титру вірусу [149]. Вірус гепатиту Е, який зберігали у культуральному середовищі, виявляли до 21 дня при 37°C, до 28 днів при кімнатній температурі та до кінця

експерименту (56 днів) при 4°C, при цьому відбувалося зниження інфекційного титру цього вірусу на 2,7 log [150].

Порівнюючи ефективність зберігання вірусів за умов гіпотермії, при –20°C та за температур від –60 до –85°C, більшість авторів підтверджують, що зниження інфекційної активності при 4 і –20°C відбувається значно швидше, ніж за низьких температур [65, 69, 71, 77, 92, 96, 99, 105, 129, 130]. Наприклад, зберігання цитомегаловірусу і вірусу вітряної віспи за різних температур показало, що інфекційні титри цих вірусів зменшуються швидше при 20 і 4°C, ніж при –70°C [77]. Заморожування зразків бактеріофага MS2 при –20°C викликало посилену інактивацію вірусу порівняно із заморожуванням при –80°C [130]. В дослідженнях із респіраторно-синцитіальним вірусом (РСВ) також було виявлено, що цей вірус втрачає свою активність швидше за температури –20°C, ніж при –70°C [105]. Про ефективність зазначеного температурного режиму зберігання свідчать результати досліджень зі зберігання вірусу грипу типу В. Вірус зберігали при кімнатній температурі і температурах 4, –20, –70°C в сольовому розчині Хенкса із додаванням альбуміну і буфера HEPES. Через 17 тижнів вірус з початковим інфекційним титром зберігся тільки при температурі –70°C. За більш високих температур він інактивувався [65, 155]. В ході порівняння ефективності температурних режимів –80, –20 та 4°C для зберігання НА-псевдотипів ретровірусу у культуральному середовищі протягом року отримані результати свідчили, що температура –80°C є більш ефективною порівняно з іншими режимами, а температури –20 та 4°C можуть використовуватись лише для короткострокового зберігання цих вірусів [153]. У дослідженні збереженості вірусу простого герпесу (ВПГ) у знежиреному молоці він не втрачав своєї активності протягом 4 місяців при –70 або –20°C. Однак інфекційні титри вірусу зменшилися приблизно на 2 порядки, коли вірус зберігали протягом того ж періоду у знежиреному молоці при 4°C [105]. Для довгострокового зберігання цього вірусу рекомендовані температура –70°C та нижче [123, 151]. Дослідження бакуловірусу, який зберігали за різних температур у безсироватковому культуральному середовищі, показали нестабільність вірусу за температур 4 та

-20°C . За температури 4°C цей вірус повністю інактивувався через 100 діб, за температури -20°C – через 160 діб. Проте за температури -80°C через 300 діб (термін спостереження) відбулося зниження інфекційної активності вірусу лише на 1 log, а в ході зберігання вірусу у рідкому азоті взагалі не спостерігали зниження його інфекційної активності [100]. Дослідження ефективності зберігання вірусу грипу А у комерційному універсальному транспортному середовищі за температур -80 , -30 , -20 , 4 та 23°C показали, що негативні температури можуть забезпечувати стабільність цього вірусу протягом 6-ти місяців без зміни його активності. При 4°C через 3 місяці вірус ще визначався у зразках, але сталася значна втрата його активності. За кімнатної температури вже через місяць зберігання зразки вірусу повністю втратили інфекційну активність [87]. За результатами іншого дослідження для зберігання суспензії вірусу грипу у культуральному середовищі рекомендовані температури від -70 до -80°C . А для його тривалого зберігання більш ефективними вважають температури пари азоту (від -135 до -150°C) [152].

В практиці роботи міжнародних, національних та відомчих колекцій мікроорганізмів кріоконсервування наряду із ліофілізацією є загальноприйнятим методом довгострокового зберігання різних вірусів. Розміщення невеликих об'ємів вірусовмісних матеріалів в кріопробірки або контейнери із вторинними захисними контейнерами дозволяє максимально знизити ризик інфікування оточуючого середовища та персоналу [68, 70, 72, 76, 80, 81, 84, 85, 95–97, 123]. Досвід кріоконсервування вірусів в колекціях показав високу ефективність цього методу відносно як простих, так і складних вірусів.

Результати досліджень, проведених з використанням вірусу грипу птиці штаму «А/Сиваш/02/05(H5N1)», консервованого в умовах морозильних камер за температур -20 і -70°C та у рідкому азоті при -196°C , показали, що через 7 місяців при -20°C відбулося зниження інфекційної активності вірусу на 0,8 lg. Після зберігання вірусу протягом 7-ми місяців за температур -70°C -196°C інфекційна активність вірусу не змінилася в порівнянні з вихідною. Електронно-мікроскопічні дослідження зразків вірусу хвороби Н'юкасла ізоляту «ІФ-07», що

зберігалися за температури -20°C протягом 30 діб, показали наявність пошкодження ліпопротеїнової оболонки віріонів, яке не відбувалося в ході зберігання вірусу у рідкому азоті за температури -196°C [156].

У дослідженні щодо зберігання очищеного за допомогою ультрафільтрації та хроматографії бакуловірусу протягом 300 діб у рідкому азоті було показано ефективність такого методу незалежно від наявності кріопротекторів у захисному середовищі. Результати показників інфекційної активності вірусу, який зберігався у середовищі без домішок, не відрізнялись від таких у середовищах із додаванням сахарози, гліцерину та ДМСО [100].

У дослідженнях по вивченню впливу кріоконсервування на бактеріофаги *E. coli* було показано, що чутливість бактеріофагів із різною будовою віріонів (T3, T4, ϕX174) до пошкоджувальних чинників кріоконсервування різна, і їх збереженість залежить від індивідуальних режимів охолодження. Було встановлено, що осмотичний шок і підвищений гідростатичний тиск викликають пошкодження бактеріофагів на етапах охолодження-відігріву. Зберігання протягом 5 років за температури -196°C не впливало на біологічні властивості бактеріофагів. Поліетиленоксид з молекулярною масою 400 у концентрації 0,13–0,38М і ДМСО у концентрації 0,64М чинили захисну дію під час кріоконсервування кріолабільного бактеріофага T4 [157–159]. В ході визначення збереженості фагів *Staphylococcus* (ϕIPLA88 , ϕIPLA35 , $\phi\text{IPLA-RODI}$ і $\phi\text{IPLA-C1C}$) при довгостроковому зберіганні за різних температур у середовищах із різними стабілізуючими домішками (дисахариди, гліцерин, сорбітол та знежирене молоко) було встановлено, що через 24 місяці за температур 20–25, 4, -20°C фаги були менш стабільними, ніж при -80 та -196°C , незалежно від стабілізатора [160].

Відомо, що білки під час заморожування піддаються впливу різних факторів: холодова денатурація, утворення льоду та концентрування розчинів [74, 94, 95, 143]. Концентрування розчинів може призводити до розділення між несумісними допоміжними речовинами, що, в свою чергу, може негативно вплинути на збереження вірусу шляхом його відокремлення від принаймні однієї

із захисних допоміжних речовин. Другим важливим фактором стресу є утворення великих поверхонь поділу лід-вода через кристалізацію льоду, що може сприяти денатурації поверхнево-чутливих білків. Також мають місце механічні пошкодження, спричинені кристалами льоду, що призводять до інактивації вірусу [74]. Крім того, заморожування білкового розчину швидко збільшує концентрацію всіх розчинених речовин у зменшеному об'ємі розчину, що залишився за рахунок утворення льоду. Таким чином, всі фізико-хімічні чинники, пов'язані з концентрацією, можуть змінюватися, а саме – іонна сила та відносний склад розчинених речовин внаслідок селективної кристалізації. Ці зміни можуть брати участь у дестабілізації природного стану внутрішньоклітинних ферментів та інших структур [74, 103, 143]. Як правило, із зниженням температури знижується швидкість хімічних реакцій. Однак хімічні реакції можуть фактично прискорюватися у частково замороженому водному розчині через підвищену концентрацію розчинених речовин. Більшість білків стабільні лише у вузькому діапазоні рН. А при екстремальних значеннях рН, які можуть виникати при заморожуванні, підвищене електростатичне відштовхування між зарядженими групами білків має тенденцію викликати денатурацію білка. Зсув рН впливає на глікопротеїни. Зміни їх конформації можуть бути оборотними, але також можуть призвести до агрегації та осадження вірусних часток [74, 94, 95]. Фактично, зниження титру вірусу корелює зі змінами в зонах вірусної оболонки, які асоціюються з інфекційними властивостями вірусу [68, 71, 74, 77, 80, 161–163].

На збереженість вірусів під час заморожування-відтавання впливає також режим відігріву. У більшості досліджень для відтавання вірусів після кріоконсервування рекомендовано швидкий відігрів зразків на водяній бані при 37°C [68, 69, 71, 72, 79, 81, 86, 92, 99, 164]. Аналогічні результати були також отримані у експериментах із бакуловірусом, який зберігали при –80°C [154], та з ВПГ-2, який зберігали при –70°C [165]. Після зберігання при –80°C та відігріву на водяній бані при 37°C інфекційна активність бакуловірусу не змінювалася, після відігріву за кімнатної температури – понижувалася. Після зберігання ВПГ-2 при –70°C у захисному середовищі із додаванням 5% ДМСО та без ДМСО інфекційні

титри вірусу у зразках, які відігривали із швидкістю 800°C/хв., були вищими, ніж у зразках, які відігривали із швидкістю 1°C/хв. [154, 165].

Зберігання вірусів в парах азоту та в рідкому азоті за температур від –120 до –196°C не знайшло широкого застосування у біотехнологічних виробництвах. Причинами цього є неможливість кріоконсервування великих об'ємів вірусомісних матеріалів, невідповідність існуючого кріогенного обладнання технологічним регламентам виробництв та вимогам регламентів по забезпеченню біологічної безпеки виробництв.

В біотехнологічних виробництвах найбільшого поширення набуло зберігання вірусів за температур від –60 до –85°C. Ці температури забезпечують достатньо тривалі терміни збереженості інфекційних титрів вірусів, які відповідають технічним регламентам виробництв. А комерційні морозильні камери дозволяють зберігати вірусомісні матеріали у великих об'ємах, необхідних для подальшого виробництва імунобіологічних матеріалів. Терміни зберігання ліофілізованих вірусів за позитивних температур обмежені [65, 68, 70, 72, 80, 92, 99, 100].

1.8.2. Ліофілізація вірусів

Протягом десятиліть для зберігання вірусів також широко використовується ліофілізація – висушування попередньо заморожених біологічних об'єктів [65, 69, 76, 80–82, 84, 92, 93, 95, 166, 167]. Позитивними сторонами цього методу є можливість зберігати велику кількість одиниць матеріалу на незначних площах робочих приміщень, тривала стабільність вірусів за умови дотримання температурних режимів зберігання, зручність транспортування [65, 69, 80, 81, 92, 93, 95, 166]. Факторами, які обмежують застосування цього методу консервування на біотехнологічних виробництвах, є технічна неможливість ліофілізації великих об'ємів вірусомісних матеріалів, більша кількість пошкоджень віріонів порівняно із зразками, що зберігають за низьких температур, необхідність додаткового пасування вірусів після ліофілізації для подальшого використання [65, 77, 92]. У зв'язку з цим ліофілізацію використовують у колекціях вірусів, у

фармацевтичній та ветеринарній промисловостях для виробництва комерційних препаратів, а саме – вакцин, імуноглобулінів та діагностикумів [65, 69, 80, 81, 92, 93, 95].

На збереженість вірусів під час ліофілізації впливають підготовка вірусомісного матеріалу, етапи процесу сублімації та склад захисних середовищ. До етапів процесу сублімації відносяться охолодження, відігрів до температури початку сублімації, сублімація, досушування до необхідних значень залишкової вологості [65, 72, 82, 84, 93, 95, 102, 106, 163]. Технологічні параметри етапів процесу сублімації в біотехнологічних виробництвах визначаються конструктивними особливостями і можливостями промислового обладнання [65, 84]. Для ліофілізації вірусів частіше використовують повільне охолодження, яке забезпечує більш сприятливу для сублімації кристалізацію води [65, 72, 82, 84]. Кінцева температура охолодження, температура початку сублімації та досушування залежать від евтектичної температури захисних середовищ та, як вказано вище, від конструктивних особливостей обладнання. Оптимальні значення залишкової вологості ліофілізованих зразків вірусів в більшості досліджень становлять 1–3% [65, 69, 72, 74, 82, 106, 168].

На збереженість ліофілізованих вірусів, як і інших мікроорганізмів, під час подальшого зберігання впливають герметичність упаковок та газовий склад в цих упаковках, показники залишкової вологості, склад захисних середовищ і температура зберігання [72, 75, 82, 84, 90, 92, 93, 95, 102, 106, 152, 163]. В якості упаковок для ліофілізації вірусів та інших мікроорганізмів використовують скляні ампули, флакони, пластикові пакети. Упаковки із ліофілізованими зразками герметизують в умовах вакууму, в середовищі інертних газів або зневодненому повітрі. Від упаковки, залишкової вологості та складу захисних середовищ залежать температурні режими і терміни зберігання ліофілізованих зразків. Завищені показники залишкової вологості та наявність кисню прискорюють хімічні та окислювальні процеси в ліофілізованих зразках під час зберігання [74, 95, 169, 170]. У зв'язку з цим на збереженість вірусів після ліофілізації суттєво впливають температурні режими зберігання. Комерційні препарати

ліофілізованих вірусів частіше зберігають за температури 4°C, рідше – при помірно низьких температурах [72, 75, 90, 92, 95, 152]. Значний досвід міжнародних колекцій вірусів свідчить про більш високу збереженість ліофілізованих вірусів при –20°C порівняно із зберіганням при 4°C [11, 65, 69, 76, 92, 99].

Склад захисних середовищ позитивно впливає на збереженість вірусів як на етапах процесу сублімації, так і при подальшому зберіганні. Інформація щодо дослідження впливу захисних середовищ на ліофілізовані віруси представлена у наступному розділі огляду літератури.

1.8.3. Застосування захисних середовищ під час зберігання вірусів за низьких температур та ліофілізації

Щоб мінімізувати вираженість пошкоджувальних чинників під час кріоконсервування та ліофілізації біологічних об'єктів використовують захисні середовища, до складу яких входять кріопротектори або стабілізатори [72, 80, 82, 99, 101, 102]. Ці сполуки запобігають розвитку більшості пошкоджувальних фізико-хімічних факторів під час заморожування біологічних структур. Кріопротектори повинні:

- сприяти збереженості біологічного об'єкту;
- бути нетоксичними;
- мати хорошу розчинність у воді;
- легко з'єднуватися з водою, проявляючи колігативні властивості;
- мати низьку евтектичну температуру;
- запобігати гіперконцентрації солей в суспензії під час охолодження;
- стабілізувати водневі з'єднання в кристалічній решітці та запобігати утворенню великих кристалів [72, 80, 103, 104].

Оболонка складних вірусів містить віруспецифічні білки, представлені глікопротеїнами, та подвійний шар ліпідів (нейтральні, фосфор- та гліколіпіди), більшість яких включаються в оболонку із мембрани клітин хазяїна під час відпочкування дочірніх популяцій віріонів [171]. Слід очікувати, що механізми

кріопошкоджень оболонок складних вірусів аналогічні механізмам кріопошкоджень мембран клітин, а кріопротектори, які є ефективними під час заморожування-відтавання клітин, будуть проявляти кріозахисні властивості і під час заморожування-відтавання складних вірусів. Ці припущення були підтверджені в ряді досліджень, виконаних на різних вірусах [65, 73, 77, 99, 100, 102, 105, 161]. Автори пов'язують захисну дію таких кріопротекторів із послабленням процесів кристалізації, стабілізацією оболонок, зменшенням концентрацій електролітів, що запобігає денатурації капсомерів та білків оболонки, та зменшенням змін рН оточуючого віріони середовища [65, 71, 77, 93, 96, 100, 101, 103, 105, 161, 162].

Зазвичай середовища для транспортування, зберігання або ліофілізації вірусів складаються з буферних розчинів для підтримання рН, білків для стабілізації віріонів та часто інших речовин, які підтримують оптимальну осмолярність та рН у межах від 7,0 до 8,0, або на яких віруси можуть адсорбуватися [65, 72–74, 84, 87, 92, 105–108]. Найчастіше у якості основи захисного середовища для зберігання вірусів використовують середовище для культивування клітин [99, 105]. Особливе значення при підборі захисних середовищ для зберігання вірусів має їх катіонний склад. Наприклад, присутність Mg^{2+} і Ca^{2+} при додаванні ФСБ в середовище відіграє головну роль під час кріоконсервації деяких вірусів, хоча ці іони зазвичай шкідливі для еукаріотичних клітин, оскільки можуть спричинити осмотичні ушкодження в евтектичній точці [65, 80, 101]. У якості білкової складової застосовують окремо або в різних комбінаціях амінокислоти, желатин, пептон, лактальбумін, знежирене молоко, сироватку крові хребетних та її компоненти. Окрім білків у якості кріопротекторів використовують сахарозу, лактозу, глюкозу, мальтозу, трегалозу, гліцерин, ДМСО, сорбітол, манітол, декстран, полігліколь, глутамат натрію [65, 69–71, 73, 76–81, 83–85, 93–95, 97–105, 108, 148, 165, 168, 172–175]. Але, на жаль, жодний з них не є однаково задовільним для всіх груп вірусів [77, 99].

Полімери та білки тваринного походження (желатин, альбуміни, пептон) використовують як захисні засоби, оскільки вони можуть змінювати температуру

замерзання розчину, мають високу поверхневу активність, перешкоджають агрегації білків, підвищують в'язкість розчину, сприяють колоїдній дисперсії вірусних часток, обмежують кристалізацію допоміжних низькомолекулярних речовин (наприклад, сахарози), зберігають значення рН розчинів [65, 72, 82, 92–94, 101, 106, 162, 163]. Сироваткові альбуміни вже давно використовуються для зберігання вірусів у концентрації 0,1–4% [101]. Желатин є найпоширенішим компонентом стабілізуючих середовищ для зберігання вірусів, а також найважливішим фактором для тривалого підтримання їх активності. Гелеутворюючі характеристики желатину та стабілізація поверхні віріонів запобігають інактивації вірусів під впливом низьких температур [79]. Для зберігання вірусів доведено захисні властивості желатину в концентрації 0,5–15% [101]. Додавання желатину до складу ліофілізованих продуктів виконує додаткові функції, такі як забезпечення адекватної механічної підтримки кінцевих ліофілізованих матеріалів, покращення зовнішнього вигляду ліофілізованих препаратів [94]. Пептон захищає інші мікроорганізми під час заморожування та відтавання в концентрації 0,4–20% [80, 101].

Сироватковий альбумін людини на рівні з ДМСО забезпечував ефективне зберігання вірусу кору, замороженого при -65°C [101]. Під час заморожування вірусу хвороби Н'юкасла до цієї ж температури СА людини показав більш виражений захисний ефект, ніж ДМСО [65, 101, 176]. За іншими даними цей вірус рекомендовано зберігати при -80°C також у захисному середовищі на основі розчину Хенкса із додаванням 2% ФС ВРХ [177]. Знежирене молоко для зберігання вірусів почали використовувати у 1952 році [105]. Воно використовується в концентрації 1–10% для кріоконсервування, але ще частіше під час ліофілізації багатьох вірусів, іноді у поєднанні з іншими захисними речовинами [101]. Так, додавання стерильного знежиреного молока до культурального середовища в ході зберігання ВПГ збільшило збереженість цього вірусу за температури -70°C порівняно з культуральним середовищем без домішок [151].

Треба зауважити, що застосування желатину, пептону та компонентів крові для зберігання вірусів, які використовуються для виготовлення вакцин, не рекомендовано через те, що ці речовини мають тваринне походження. Їх наявність у готовій вакцині може викликати небажані побічні реакції. Тому такі речовини слід використовувати тільки для зберігання вірусу, який використовується у лабораторних дослідженнях [79]. Найчастіше неможливо уникнути використання компонентів крові в ході отримання вірусу у культурі клітин. Тому альтернативою для компонентів крові тварин є використання СА людини, що зменшує ризик виникнення побічних реакцій після використання вірусних вакцин [14, 22, 37, 52, 35, 122]. Також у якості альтернативи желатину для зберігання вірусів та живих вірусних вакцин рекомендовано використовувати такі гелеутворюючі речовини рослинного походження як каррагінан та альгінат натрію [79].

В області швидко зростаючої галузі біотехнології для іммобілізації клітинних та ферментних систем знайшли застосування альгінати [178–182]. Альгінати – це група природних аніонних полісахаридів, які отримують із клітинних стінок різних видів бурих водоростей. Ці сполуки можуть легко переходити в різноманітні напівтверді або тверді структури через унікальну здатність до золь-гель процесу [181, 183, 184]. Тому альгінати (найчастіше, альгінат натрію) зазвичай використовують для підвищення в'язкості розчинів та у якості стабілізаторів суспензій та емульсій у харчовій, медичній та фармацевтичній промисловості [181–184]. Перевагами цієї речовини є те, що вона нетоксична та біосумісна [181, 184]. Всі ці властивості дозволяють використовувати альгінат натрію для кріоконсервування деяких клітин, тому що він може підвищити стійкість клітин до осмотичного набряку та швидко поглинає воду [180–182, 184]. Кріозахисні властивості гелів каррагінану та альгінату під час заморожування вірусів не вивчали.

Цукри та багатоатомні спирти також тривалий час використовуються як кріопротектори під час заморожування мікроорганізмів, в тому числі вірусів [84, 102]. Ці речовини мають схожі захисні механізми, оскільки вони мають однакові

функціональні (гідроксильні) групи, завдяки яким вони здатні заміщати воду під час зневоднення, зберігаючи біологічні структури у гідратному стані [65, 71, 84, 93, 94, 102, 162, 185]. Моно- та дисахариди можуть адсорбуватися на поверхні віріону, де вони утворюють в'язкий шар, гальмують ріст кристалів льоду за рахунок збільшення в'язкості розчину та підтримують структуру аморфного льоду в безпосередній близькості до віріону [101]. Сахароза досить часто використовується для кріоконсервації різних біологічних об'єктів, у тому числі і вірусів, у концентраціях 1–68% [96, 101, 104].

Проникаючі кріопротектори диметилсульфоксид (ДМСО, C_2H_6SO) та гліцерин (гліцерол, 1, 2, 3 пропантріол, $C_3H_8O_3$) вже давно використовуються як компоненти середовищ для зберігання клітин та вірусів у замороженому стані [76, 80, 81, 97, 101, 103–105, 142, 161, 175, 186, 187]. Ці гідрофільні речовини через наявність хімічних груп, що утворюють міцні водневі зв'язки з водою, можуть захищати вірусні білки від термічного руйнування. ДМСО та гліцерин також понижають температуру замерзання води та біологічних рідин. Тому вони зменшують концентрацію солей, розчинених у розчинах, у свою чергу, гальмуючи осмотичний шок. Ці речовини також запобігають евтектичній кристалізації [71, 101, 103, 175, 187]. Крім цього гліцерин має розчинні та абсорбуючі властивості [144]. Важливо, що гліцерин та ДМСО разом не застосовуються [99, 101]. Недоліком використання гліцерину та ДМСО є те, що ці речовини в певних концентраціях можуть бути токсичними для вірусів [65, 101, 105].

Було досліджено кріозахисні властивості ДМСО під час зберігання вірусів за низьких температур у концентрації 1–32% [96, 80]. Але зазвичай ДМСО, так само як і гліцерин, застосовують у концентрації 2–10% [80, 81, 97, 99, 101, 175].

Показано, що наявність ДМСО в захисному середовищі сприяє стабільності ВПГ навіть під час серії з чотирьох циклів заморожування-відтавання. Ефективність ДМСО порівнювали з ефективністю ФС ВРХ в ході зберігання таких складних вірусів як ВПГ, вірусів кору, везикулярного стоматиту та вірусу Сіндбіс при $-40^{\circ}C$. Результати цих досліджень показали, що і ФС ВРХ в

концентрації 20%, і ДМСО в концентраціях 5-20% надавали виражений протективний ефект. Імовірно, це пов'язано зі здатністю ДМСО стабілізувати ліпопротеїновий комплекс вірусних часток [65, 105, 161]. Показана ефективність застосування даної речовини також для зберігання вірусів грипу і кору при -65°C [65, 176]. Додавання ДМСО до культурального середовища у концентрації 10% забезпечувало більшу збереженість бакуловірусу при -80°C порівняно з культуральним середовищем без додаткових компонентів [154].

Гліцерин застосовують для зберігання вірусів у широкому діапазоні температур у концентраціях 2–55%, але зазвичай, так само як і ДМСО, у концентраціях 2–10% [65, 81, 96, 99, 101, 173]. Вважається, що гліцерин краще захищає біологічні об'єкти при фізіологічних температурах ніж за більш низьких температур [72].

Нерозведений або 50% гліцерин застосовували для збереження патогенних прокаріотів та вірусів за температур від 4 до -20°C задовго до 1950-х років. Пізніше для заморожування різних вірусів гліцерин почали застосовувати в концентраціях 2–55% [101]. Так, додавання гліцерину до культурального середовища у концентрації 30% забезпечувало більшу збереженість бакуловірусу при -80°C порівняно з культуральним середовищем без додаткових компонентів [154]. Дослідження збереженості вірусу пташиного грипу свідчить про те, що додавання 10% гліцерину у середовище на основі ФСБ призвело до покращення його збереженості порівняно з ФСБ без додаткових стабілізуючих компонентів під час транспортування та зберігання за температур 4 та -20°C [188]. Середовище на основі води із додаванням 10% гліцерину забезпечувало збереженість ВПГ-2 при -70°C [165]. Для зберігання аденовірусів людини рекомендовано використовувати середовище на основі трис-буфера з 30% гліцерину. Таке середовище та температурні режими від -35 до -70°C дозволяють зберігати ці віруси до 5-ти років без значущої втрати інфекційної активності [189]. Вірус Сіндбіс рекомендовано зберігати у культуральному середовищі із додаванням 10% гліцерину при -80°C [167].

Застосування комбінованих середовищ як для ліофілізації, так і для кріоконсервування забезпечує більш високий відсоток життєздатності вірусів порівняно з однокомпонентними захисними середовищами [80]. Було помічено, що захисні речовини можуть взаємодіяти одна з одною у сумішах, тим самим реалізуючи ефекти, відмінні від тих, що мали місце під час застосування цих речовин окремо. В результаті захисний ефект від комбінацій кріопротекторів може бути більш вираженим, ніж можна було б очікувати при застосуванні кожної речовини окремо. Часто доцільно поєднувати використання таких речовин як ДМСО або гліцерин з глюкозою або сахарозою [86, 101].

Додавання до ФС ВРХ сахарози (0,25, 0,5 та 1 М), гліцерину та ДМСО (2,5, 5 та 10%) дозволили забезпечити збереженість очищеного бакуловірусу за температури -70°C та за температури рідкого азоту [100].

Зберігання РСВ (штам Memphis 37) при -80°C протягом 3-х тижнів у середовищах на основі ФСБ та 10% ФС ВРХ із додаванням різних концентрацій сахарози (0, 3, 5, 8, 10, 15 та 20%) продемонструвало те, що збільшення концентрації сахарози покращує збереженість цього вірусу в таких умовах [164].

Для того, щоб підвищити збереженість вірусу чуми дрібної рогатої худоби за різних температур (-80 , 4 та 37°C) використовували середовища на основі трис-буфера для уникнення перепадів рН із додаванням EDTA у якості антиоксиданту, Tween 80 у якості поверхневоактивної речовини для уникнення агрегації вірусів, сахарози або трегалози (1 М). Ці захисні середовища порівнювали з композицією, яка зазвичай використовується для цих цілей (розчин Хенкса із додаванням 2,5% лактальбуміну, 1% глутамату натрію, 5% сахарози). Після тривалого зберігання при -80°C найкращу стабільність спостерігали у середовищах на основі трис-буфера із додаванням як сахарози, так і трегалози. Активність вірусу зберігалася принаймні 3,5 року. Найефективнішим за температур 4 та 37°C виявилось середовище на основі трис-буфера із додаванням трегалози. Це середовище також показало ефективність для ліофілізації вірусу та подальшого зберігання за температур 4, 37 та 45°C [90, 190].

Дослідження Howell та Miller показали, що 0,2 М розчин сахарози у ФСБ давав кращі результати, ніж 70% розчин сорбітолу, для стабілізації цитомегаловірусу, вірусу вітряної віспи, РСВ та ВПГ 1 типу після зберігання за температур 4, 20 та -70°C [77]. У іншому дослідженні зразки штамів РСВ, що зберігалися у середовищі SPGA за температури -80°C , утримували початкову інфекційну активність протягом 45 тижнів [166].

Стабільність аденовірусу протягом одного циклу заморожування-відтавання суттєво підтримували кріопротекторні розчини, які містили 0,5 М сахарози, 0,5 М трегалози та 10% сорбіту з 0,4% желатину [162].

Збереження інфекційних титрів РСВ, замороженого до -86°C , спостерігали в ростових середовищах із додаванням наступних захисних речовин: 0,5% желатину та 0,3 М глютамату натрію (термін спостереження – 6 місяців); 3,5% ДМСО (термін спостереження – 2 роки); 45% ФС ВРХ або 40% гліцерину, або цукрів (25% сахарози, 10% трегалози і 10% сорбітолу) (термін спостереження – 3 роки). Під час зберігання РСВ при -70°C ефективним було використання середовища на основі ФСБ з 0,2 М сахарози, а також ростового середовища, що містить 2% ФС ВРХ. Як стабілізатори для зберігання вірусу грипу типів А і В при -70°C рекомендовані глюкоза та альбумін [65, 155, 191].

В ході дослідження стабільності РСВ після утримання за температур -86 , 37, 56°C та після декількох циклів заморожування-відтавання найкращі показники збереженості забезпечили середовища з 25% сахарози, 10% трегалози та 10% сорбітолу. Гліцерин (40%) та ДМСО (3,5%) давали хороший стабілізуючий ефект для цього вірусу після декількох циклів заморожування-відтавання [64]. Віруси родини герпесвірусів стабілізували за низьких температур за допомогою сироватки крові, гліцерину, сорбітолу, сахарози, знежиреного молока або інших білків [161].

Ключовим обмежуючим фактором у кріобіології вважається токсичність кріопротекторів. Ця токсичність може обмежувати використання ряду речовин з декількох причин. По-перше, токсичність не дозволяє використовувати підвищені концентрації кріопротекторів, що зменшує ефективність цих засобів. По-друге,

зараз існує певна кількість доказів того, що кріопротекторні агенти, незважаючи на їх переваги, насправді можуть відігравати пряму роль у утворенні кріопошкоджень. По-третє, підвищені концентрації деяких кріопротекторних речовин роблять неможливим їх подальше використання для виробництва [186, 187]. До токсичних кріопротекторів, які дають виражений захисний ефект під час зберігання вірусів, відносять гліцерин та ДМСО [65, 72, 85, 101, 142, 186, 187, 175].

Для ліофілізації таких складних вірусів як, герпесвіруси та віруси парагрипу ВРХ та собак, коронавірус ВРХ, вірус трансмісивного гастроентериту свиней, більш ефективним було середовище на основі живильного середовища з 3% ФС ВРХ із додаванням 2,5% желатину та 3,5% сахарози, ніж із додаванням 10% знежиреного молока та 1% глютамата натрію. Але для представників простих вірусів, таких як аденовіруси ВРХ та собак, ентеровірус ВРХ, тешовірус свиней та каліцівіруси, середовище з желатином та сахарозою не продемонструвало захисних властивостей [65, 93]. Для ліофілізації вірусу грипу рекомендовано використовувати захисне середовище на основі ФСБ із додаванням 5% сухого молока, або 4% трегалози, або 10% сахарози та 5% пептону [152, 169]. Для ліофілізації РСВ рекомендовано використання середовища на основі ФСБ з 0,2 М сахарози, 0,005 М глютамату натрію і 1% СА ВРХ [65, 69]. Під час дослідження стабільності живої атенуйованої вакцини проти чуми дрібних жуйних тварин, ліофілізованої із різними наповнювачами, найбільший захисний ефект забезпечувала композиція гідролізату лактальбуміну (5%) і сахарози (10%) [65, 69, 192, 193]. В ході ліофілізації вірусу інфекційного ринотрахеїту найвищі стабілізуючі властивості мали середовища з желатином (1,5–3%) та сахарозою (5–7,5%) [194]. Виявлена ефективність сахарози у концентрації 10% для ліофілізації та подальшого зберігання атенуйованого штаму 17D вірусу жовтої лихоманки [170]. Додавання 0,5% желатину та 2% сорбітолу до стабілізуючого середовища забезпечувало високу збереженість живої вакцини проти вірусного гепатиту качок [195]. Для ліофілізації живих вакцин проти кору, паротиту та краснухи використовують середовище на основі ФСБ із додаванням сахарози,

трегалози, глютамату натрію і СА людини [65, 69, 174]. Під час ліофілізації вірусу грипу (штам PR8) у якості стабілізуючих речовин використовують лактобонат кальцію і СА людини в фізіологічному розчині з кінцевої концентрацією кожної речовини 1% [65, 69].

В одному з досліджень стійкість восьми штамів РСВ порівнювали після того, як штами були сублімовані в присутності та без стабілізатора SPGA (sucrose, phosphate, glutamate, albumin), який містить 218 mM сахарози, 7,1 mM гідрофосфат калію, 3,76 mM дигідрофосфат калію, 4,9 mM глютамат натрію і 1% альбуміну ВРХ. У зразках штамів РСВ, ліофілізованих у присутності SPGA, протягом 45-ти тижнів зберігання при -80 або -20°C відбулися відносно невеликі втрати інфекційного титру. Активність ліофілізованих вірусів, що зберігалися при 4°C , залишалася стабільною протягом 12-ти тижнів, але після цього почала зменшуватись, а втрати інфекційного титру при 25 і 37°C були значно більшими [102, 166].

Довгострокові дослідження стабільності ліофілізованого аденовірусу, які проводили при 4°C з використанням розчинів 10% сорбіту з 0,4% желатину та 0,5 М сахарози у ФСБ та трис-буфері, показали адекватну стабільність цього вірусу через 150 днів після ліофілізації в усіх досліджених середовищах [162].

Додавання перед ліофілізацією до суспензії вірусу блютанга (збудник катаральної лихоманки овець) 10% трегалози забезпечувало найкращий результати з активності цього вірусу порівняно з пептоном, лактозою та 5% трегалози. Висушені зразки зберігали за кімнатної температури та при 4°C протягом 8 тижнів [172].

В ході розробки вакцин допоміжними речовинами вважаються усі хімічні сполуки, що використовуються у виробництві, включаючи: суспендуючу рідину (наприклад, стерильну воду, сольовий буфер або рідини, що містять білок), консерванти (наприклад, антибіотики, тіомерсал), стабілізатори та ад'юванти, що сприяють ефективності вакцини, а також сліди матеріалів, які використовувались для культивування вірусу та його зберігання. Склад вакцин варіюється від одного продукту до іншого, і різні вакцини з одним і тим же активним фармацевтичним

інгредієнтом можуть мати істотно різний склад. Але завдання виробників, за можливості, на всіх етапах виробництва використовувати безпечні речовини, зменшувати кількість та концентрації антибіотиків, токсичних речовин, консервантів та матеріалів тваринного походження, що зумовлено існуючими та потенційними проблемами безпеки від зараження випадковими агентами або виникнення алергічних реакцій. В ході виробництва вакцин суворо контролюється використання ФС та СА ВРХ, головною загрозою якого є ризик зараження губчастою енцефалопатією ВРХ. Рекомендовано зменшувати використання цих речовин або замінювати їх. Незважаючи на те, що желатин є ключовим компонентом для більшості ліофізованих вакцин та в цілому вважається безпечною допоміжною речовиною, його тваринне походження все ще викликає занепокоєння щодо його безпеки через наявність випадкових агентів або алергенних властивостей. Тому найбільш перспективним в ході виробництва вакцин є використання у якості стабілізаторів цукрів та інших речовин нетваринного походження [73].

1.8.4. Зберігання вірусу сказу

Зберігання вірусу сказу в гліцерині вперше було описано у 1887 році. Виділені з мозку зразки вірусу зберігали у високих концентраціях гліцерину протягом 30 діб за температури 34–37°C. Але зараз цей метод рідко використовується, оскільки для збереження вірусу дослідники надають перевагу охолодженню [114]. За даними літератури для тривалого зберігання зразки ВС, що використовуються для епідеміологічних досліджень та інших цілей, і біологічні матеріали, позитивні на сказ, слід підтримувати за температур від –30 до –80°C, щоб зберегти вірус життєздатним протягом декількох років [4, 96, 120]. Але за відсутності необхідного обладнання допускається зберігання таких зразків за температури 4°C до 2 діб, –20°C – до 4-х тижнів [4, 120].

У дослідженні штаму CVS 31.2, отриманого методом пасування через мозок лабораторних мишей, його зберігали протягом 2-х років у захисних середовищах з ДМСО, гліцерином, сахарозою та поліетіленгліколем з молекулярною масою 6000

за температури -20°C . Зразки ВС, що зберігалися у середовищі з сахарозою у концентрації 68%, продемонстрували максимальну ступінь активності після 1 року зберігання і були єдиними зразками, які містили живий вірус після 2 років зберігання [96].

У дослідженні Costa та ін. були випробувані різні протоколи кріоконсервування зразків ВС, що зберігалися короткий час за температури -20°C . Дослідження показало, що після зберігання при -20°C протягом 30-ти днів інтенсивність флуоресценції часток ВС була нижчою, ніж у свіжих зразках. Використання у якості кріопротектору сахарози у концентраціях 10 та 68% мало позитивний ефект для цього терміну зберігання [71, 96].

Для зберігання ВС штаму PV при -80°C використовували ростове середовище на основі поживного середовища Ігла із додаванням 5% ФС ВРХ [41, 45, 49].

Згідно з рекомендаціями ВООЗ для зберігання таких виробничих виробничих штамів ВС як РМ, Flury-LEP та CVS-11 у замороженому стані бажано використовувати температури нижче -60°C [1, 11, 17, 26, 28, 29, 41, 54, 61–63, 65, 109, 110] та консервуючі суміші на основі культуральних середовищ [11, 54, 65]. Для зберігання штаму CVS-11 використовують трис-буфер із додаванням низьких концентрацій СА ВРХ [1].

Результати, отримані у ході ліофілізації вірусу сказу культурального штаму РБ-71 та мозкових штамів CVS та «О» у різних середовищах та подальшого зберігання за різних температур (4, -10 , -40 , -70°C) протягом 4-х років, свідчили про те, що температура -70°C найбільш ефективна порівняно з іншими умовами зберігання препаратів вірусу. Середовище «№3 ВГНКИ», розроблене у Всеросійському державному центрі якості та стандартизації лікарських засобів для тварин і кормів (Москва, Росія), за всіх досліджуваних температур та у тесті прискореного старіння (тиждень зберігання за температури 60°C) було більш ефективним, ніж захисні середовища зі знежиреним молоком, желатином, пептоном та сорбітом, як в ході ліофілізації, так і в ході подальшого зберігання [195].

В ході дослідження стабільності вірусу сказу штаму «Щолково-51 К», ліофілізованого в різних захисних середовищах, при зберіганні за температури 18°C протягом 12-ти місяців та у тесті прискореного старіння (тиждень зберігання за температури 37°C) найбільш ефективним було середовище на основі гіпертонічного (4%) розчину натрію хлориду із додаванням сахарози (8%) та желатози (10%) [197].

Після ліофілізації вірусу сказу штаму ERA у середовищах на основі ФСБ без додавання та із додаванням різних концентрацій сахарози (1; 0,5; 0,25; 0,1 М) у всіх зразках відбулося зниження інфекційної активності вірусу, найефективнішим було середовище, яке містило 1 М сахарози [198].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти дослідження

Робота була виконана на базі АТ «БІОЛІК» в рамках розробки антирабічних вакцин для ветеринарної та гуманної медицини та Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

У дослідженні використовували промислові фіксовані штами вірусу сказу:

- вакцинний штам L. Pasteur (№ 2061/Vero 15 пасаж), адаптований до клітин Vero та ВНК-21 clone 13 [30, 46, 47], наданий Інститутом Пастера (Нові-Сад, Сербія) [122];

- стандартний штам CVS (Challenge virus standard), наданий Державним науково-дослідним інститутом стандартизації та контролю медичних біологічних препаратів ім. Л.О. Тарасевича (Москва, Росія) та адаптований до перещеплюваної культури клітин ВНК-21 clone 13 в АТ «БІОЛІК».

Штами було задепоновано (свідоцтва №№ 678, 679) у депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (Київ, Україна).

2.2. Заходи безпеки

Роботу з вірусом виконували після курсу ПрЕП [4, 12, 17] у спеціалізованому одязі з використанням засобів індивідуального захисту. Збір матеріалів, які були у контакті з вірусом, проводили у контейнери з дезінфікуючим розчином [17, 199]. Для інактивації залишків вірусу та дезінфекції матеріалів, які були у контакті з вірусом, використовували 6% розчин перекису водню, 70% розчин етилового спирту та подальше автоклавування протягом 2-х годин за температури 134°C під тиском 2 атм [4, 12].

2.3. Отримання суспензії вірусу

У якості субстрата для культивування вірусу використовували перещеплювані клітинні культури ВНК-21 clone 13 (клітини нирки новонародженого сірійського хом'яка) та Vero (клітини нирки африканської зеленої мавпи).

Для експериментів з ліофілізації вірусу сказу штаму L. Pasteur використовували культуру клітин ВНК-21 clone 13, яка була отримана з Колекції культур клітин хребетних Інституту цитології РАН (Санкт-Петербург, Росія). В подальших дослідженнях використовували культури клітин ВНК-21 clone 13 та Vero, які були придбані через компанію «Sigma-Aldrich» (Сент-Луїс, США) у Європейській колекції клітинних культур («ECACC», Портон Даун, Великобританія).

Перед зараженням культури клітин пересівали з концентрацією посівної дози $2-4 \times 10^4$ клітин/см² та культивували одну добу у пристінковому моношарі в стерильних пластикових культуральних флаконах («SPL», Німеччина) з площею поверхні 175 см² у поживному середовищі DMEM («Biowest», Франція) із додаванням 10% (v/v) ФС ВРХ («Sigma-Aldrich», США) в СО₂-інкубаторі («Binder», Німеччина) при $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ і 5% СО₂. Експозицію клітин із вірусною суспензією проводили протягом години у СО₂-інкубаторі («Binder») при $(33 \pm 2)^\circ\text{C}$ і 5% СО₂. Потім у культуральні флакони вносили ростове середовище (РС) для вірусу на основі DMEM із додаванням різних ростових факторів та культивували вірус за тих самих умов. На 4-ту добу після зараження вірусну суспензію очищали від клітинного детриту протягом 15 хв. при 2000 g та 4°C у рефрижераторній центрифугі («MPW», Польща).

2.4. Визначення інфекційної активності вірусу

Як вже зазначалося, ВС має обмежену цитотоксичність *in vivo* та *in vitro*. Внаслідок нелітичної природи вірусу визначення його концентрації загальноприйнятими методами бляшкоутворення та за цитопатичною дією неможливе, тому титрування вірусу сказу в культурі клітин зазвичай виконують

візуалізацією фокусів інфікованих клітин за допомогою антиген-специфічних антитіл до ВС, кон'югованих з флуоресцеїном [1]. Для визначення активності вірусу використовували прямий метод FAT, який полягає у реакції зв'язування антигену вірусу сказу зі специфічними антирабічними антитілами, міченими ізотіоціанатом флуоресцеїну. Цей барвник найчастіше використовують під час роботи з вірусом сказу. Продукт реакції антигену з антитілом спостерігають за допомогою флуоресцентного мікроскопу [120]. Метод FAT є надійною та чутливою методикою демонстрації наявності ВС в культурі клітин. У зафіксованих клітинах антигеном, який переважно забарвлюється ізотіоціанатом флуоресцеїну, є нуклеопротеїн (N білок) нуклеокапсиду, тоді як фарбування нефіксованих клітин виявляє переважно вірусний глікопротеїн (G білок), розташований на клітинній плазматичній мембрані [42, 60]. При цьому під ультрафіолетовим світлом мікроскопу комплекси антигенів ВС з антитілами набувають яскравого забарвлення, яблучно-зеленого або зеленувато-жовтого кольору, яке добре видно на темному тлі [120]. Для визначення інфекційної активності ВС використовують метод розрахунку 50%-ної кінцевої точки розведення, який полягає у визначенні розведення вірусу, в якому відбувається інфікування 50% об'єктів. Для цього методу можуть використовуватися різні об'єкти – як лабораторні тварини, так і культури клітин. Для визначення цього показника існує декілька методів різної складності та точності. Один з них – метод Ріда та Менча. Але дивлячись на те, що цей метод полягає у використанні кумулятивних даних [110, 200–202], що може привести до великої похибки, у роботі використовували рекомендований ВООЗ метод Спірмена-Карбера [11, 17, 59, 200, 202], який полягає у розрахунку десятичного логарифма 50%-ної кінцевої точки розведення вірусної суспензії [17, 26, 200, 202]. Активність (титр) ВС у тестах *in vivo* (на моделі лабораторних мишей) виражають як летальну дозу (lethal dose – LD) або інфікуючу дозу (infective dose – ID) [28, 60, 201, 202]; у тестах *in vitro* – як інфекційну дозу для тканинної культури (tissue culture infective dose – TCID) [11, 17, 26, 54, 59, 60], фокус-утворюючі одиниці (focus-forming units – FFU) [1, 30, 57, 60, 62, 109, 203], фокус-утворюючу дозу (focus-forming dose –

FFD) [11, 17, 20, 39, 41] та інфекційну дозу для культури клітин (cell culture infective dose – CCID) [16, 17, 20, 25, 28].

В роботі інфекційну активність вірусу сказу визначали методом титрації в культурі клітин лінії ВНК-21 clone 13. Для цього у 96-ти лункових культуральних планшетах («TPP», Швейцарія) за допомогою багатоканального механічного дозатору зі змінним об'ємом («Biohit Proline Plus», Фінляндія) готували п'ятикратні розведення вірусу у ростовому середовищі на основі DMEM («Biowest») із додаванням 10% (v/v) ФС ВРХ («Sigma-Aldrich»). На кожне розведення вірусу приходилося 4 лунки планшета. Кожен зразок титрували у п'яти повторах. До розведень вірусу вносили суспензію клітин з концентрацією 5×10^5 клітин/мл. Клітини у планшетах культивували в CO₂-інкубаторі («Binder») при $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ і 5% CO₂ протягом 48-ми годин [1, 11, 17, 20, 25, 26, 28, 38, 39, 48, 50, 58, 59, 203, 204]. Моношар культури клітин промивали ФСБ («Biowest»), фіксували охолодженим при -20°C ацетоном протягом 30-ти хвилин та забарвлювали специфічними моноклональними антитілами до вірусу сказу, міченими ізотіоціанатом флуоресцеїну («Fujirebio», США), при 37°C протягом 40 хвилин. Після цього моношар промивали ФСБ («Biowest») та висушували у темному місці [1, 11, 17, 20, 25, 26, 28, 38, 39, 48, 58, 59, 62, 203, 204]. За допомогою лабораторного мікроскопа («Leica DM2000», Німеччина) з модулем флуоресценції при $\times 100$ (об'єктив $10\times$, окуляр $10\times$) реєстрували наявність у кожній з чотирьох лунок планшета яскравого специфічного світіння зеленого кольору, яке свідчило про зараження клітин вірусом сказу (рис. 2.4.1) [1, 20, 39, 50, 58, 59, 62, 110, 203–205]. Інфекційну активність вірусу розраховували методом Спірмена-Кербера і виражали у десятковому логарифмі CCID₅₀ за формулою:

$$\lg \text{CCID}_{50} = x_0 - d/2 + d \sum r_i / n_i, \quad (2.4.1)$$

де x_0 – \lg зворотнього найбільшого розведення вірусу, в якому всі лунки мають позитивне світіння; d – \lg фактора розведення вірусу; r_i – кількість лунок з позитивним світінням у кожному розведенні; n_i – загальна кількість лунок у кожному розведенні [17, 26, 200, 202].

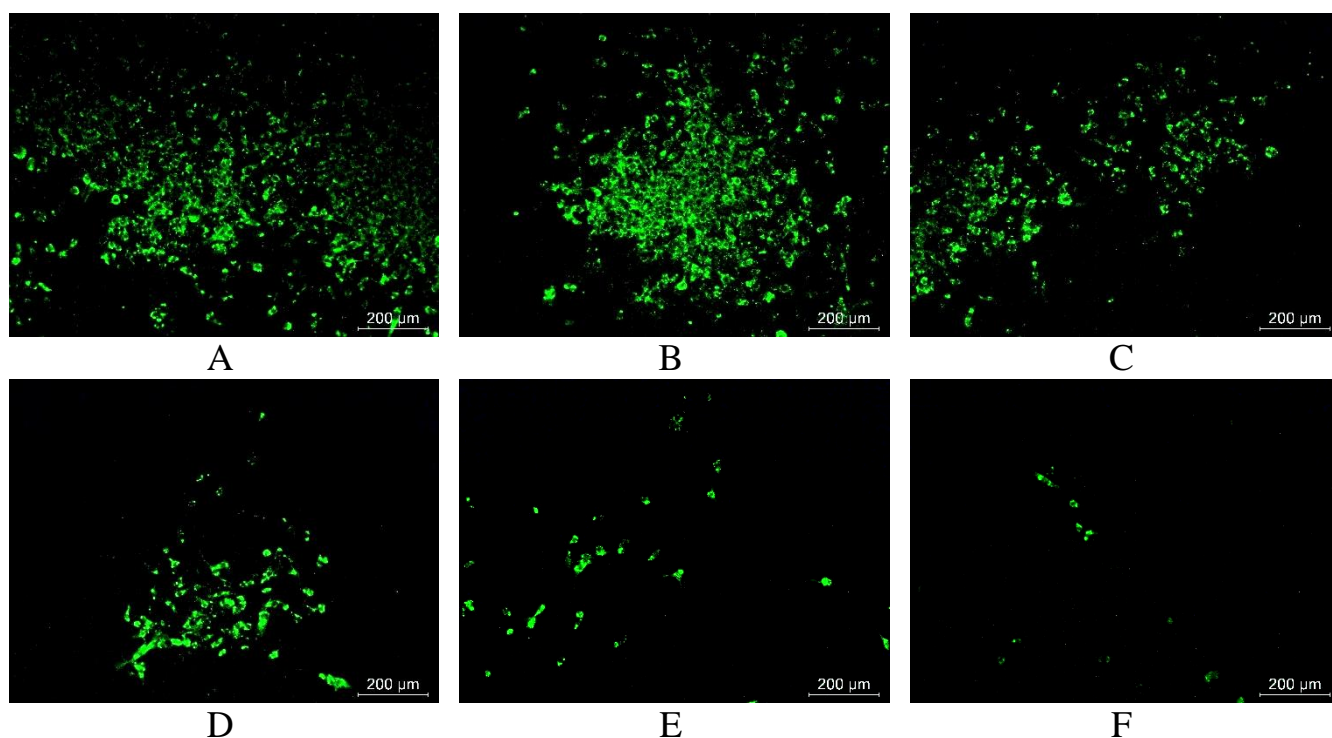


Рис. 2.4.1. Моношар культури клітин ВНК-21 clone 13, інфікованої вірусом сказу штаму L. Pasteur у різних розведеннях: (А) – 1:125, (В) – 1:625, (С) – 1:3125, (D) – 1:15625, (Е) – 1:78125, (F) – 1:390625.

Примітка: Забарвлення специфічними моноклональними антитілами до вірусу сказу, міченими ізотіоціанатом флуоресцеїну, $\times 100$.

2.5. Заморожування штамів CVS та L. Pasteur до -20 , -80°C і зберігання за цих температур протягом 12-ти місяців

Культуру клітин ВНК-21 clone 13 заражали вірусом сказу штам CVS із інфекційною активністю $(5,87 \pm 0,16)$ lg CCID₅₀, штам L. Pasteur – $(6,78 \pm 0,15)$ lg CCID₅₀. У якості РС для обох штамів використовували DMEM («Biowest») із додаванням 0,1% СА ВРХ («Sigma-Aldrich»). Під час підготовки до заморожування після очищення від клітинного детриту в супернатанти вірусу, суспендованого у РС, додавали в різних концентраціях наступні захисні речовини: сахарозу («AppliChem»), гліцерин («AppliChem»), ДМСО («AppliChem»), желатин («Генезіс»), альгінат натрія («Sigma-Aldrich») і пептон («HiMedia Laboratories Pvt. Limited», Індія) (табл. 2.6.1).

Склад захисних середовищ, які використовували для зберігання штамів CVS та L. Pasteur за низьких температур протягом 12-ти місяців

Захисне середовище	Склад	Захисне середовище	Склад
1	РС*	4/3	РС + 7,5% ДМСО
2/1	РС + 2,5% сахарози	4/4	РС + 10% ДМСО
2/2	РС + 5% сахарози	5/1	РС + 1% желатина
2/3	РС + 7,5% сахарози	5/2	РС + 3% желатина
2/4	РС + 10% сахарози	6/1	РС + 1% альгінату натрія
3/1	РС + 2,5% гліцерину	6/2	РС + 2% альгінату натрія
3/2	РС + 5% гліцерину	6/3	РС + 3% альгінату натрія
3/3	РС + 7,5% гліцерину	7/1	РС + 2,5% пептону
3/4	РС + 10% гліцерину	7/2	РС + 5% пептону
4/1	РС + 2,5% ДМСО	7/3	РС + 7,5% пептону
4/2	РС + 5% ДМСО	7/4	РС + 10% пептону

Примітка: * – DMEM із додаванням 0,1% СА ВРХ.

Вірусну суспензію в зазначених захисних середовищах механічним дозатором зі змінним об'ємом («Biohit Proline Plus») вносили по 1 мл у стерильні пластикові кріопробірки («SPL») і зберігали у морозильних камерах («National Lab») при (-20 ± 2) та $(-80 \pm 5)^\circ\text{C}$. Оцінку збереженості зразків проводили за визначенням інфекційної активності вірусу перед зберіганням, через тиждень та 1, 3, 6 та 12 місяців зберігання (термін спостереження).

Для оцінки ефективності захисних середовищ в ході зберігання вірусу в якості контролю використовували дані з інфекційної активності зразків до заморожування. Також, оцінювали різницю в ефективності температурних режимів -20 та -80°C . На кожному з термінів зберігання порівнювали досліджуваний показник з таким на попередньому терміні. Крім того, через

12 місяців зберігання результати порівнювали з інфекційною активністю вірусу в середовищі 1 (РС без домішок) за кожної з температур.

2.6. Зберігання штаму CVS за різних температур протягом 24-х місяців

У цьому експерименті культуру клітин ВНК-21 clone 13 заражали вірусом із інфекційною активністю $(4,79 \pm 0,15)$ Іg CCID₅₀. У якості РС використовували DMEM («Biowest») із додаванням 0,5% (v/v) ФС ВРХ («Sigma-Aldrich»). У зразки зібраного після очищення супернатанту вносили сахарозу («AppliChem»), гліцерин («AppliChem») і мальтозу («Sigma-Aldrich»). Для зберігання вірусу використовували такі середовища: 1 – РС без домішок; 2 – РС + 5% сахарози; 3 – РС + 5% гліцерину; 4 – РС + 5% сахарози та 5% гліцерину; 5 – РС + 5% мальтози. Суспензію вірусу в зазначених захисних середовищах механічним дозатором зі змінним об'ємом («Biohit Proline Plus») вносили по 1 мл у стерильні пластикові кріопробірки («SPL») та поміщали на зберігання. Для проведення тесту прискореного старіння, який використовується у фармацевтичній промисловості для оцінки стабільності та строку придатності препаратів, вірус зберігали у термостаті («Binder») при $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$. Для дослідження можливості зберігання зразків вірусу в умовах гіпотермії використовували холодильну камеру («Liebherr», Німеччина) з температурою $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$. Для зберігання за низьких температур зразки поміщали в морозильні камери («National Lab», Німеччина) з температурами (-20 ± 2) , $(-80 \pm 5)^\circ\text{C}$, та у посудини Дьюара (Харківський завод транспортного обладнання, Україна) з рідким азотом (-196°C) . Швидкості охолодження до вказаних температур не контролювали. Інфекційну активність зразків оцінювали перед зберіганням, а також через тиждень та 3, 6, 12, 18 і 24 місяці (термін спостереження).

Ефективність зберігання вірусу оцінювали за показниками інфекційної активності вірусу після зберігання за різних температур порівняно із інфекційною активністю вірусу до розміщення на зберігання (контроль). Визначали вплив температурних режимів на ефективність зберігання вірусу. Крім того, на кожному з термінів зберігання порівнювали досліджуваний показник з таким на

попередньому терміні, а через 24 місяці – з таким у середовищі без домішок за умов зберігання при кожній із температур.

2.7. Зберігання штаму L. Pasteur за різних температур протягом 24-х місяців

У цьому експерименті культуру клітин Vero заражали вірусом із інфекційною активністю $(5,14 \pm 0,14)$ Іg CCID₅₀. У якості РС використовували DMEM («Biowest») із додаванням 0,5% СА людини («Sigma-Aldrich»).

Для зберігання вірусу використовували ті ж самі захисні середовища та температурні режими, що і в попередньому експерименті.

Інфекційну активність вірусу визначали перед поміщенням на зберігання в усіх досліджуваних захисних середовищах. Оцінку збереженості зразків, які зберігалися при (37 ± 2) та $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$, проводили через 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 и 180 діб (термін спостереження). Інфекційну активність вірусу, який зберігали при (-20 ± 2) , (-80 ± 5) та -196°C , визначали через тиждень, 3, 6, 12, 18 та 24 місяці зберігання (термін спостереження).

У якості контролю для оцінки ефективності зберігання вірусу використовували показники інфекційної активності зразків до розміщення на зберігання. В ході вивчення динаміки змін інфекційної активності вірусу за кожної з температур аналізували значущість зміни активності порівняно з попереднім терміном зберігання. Через 24 місяці зберігання результати порівнювали з інфекційною активністю вірусу в середовищі 1 (РС без домішок) за кожної з температур та оцінювали різницю в ефективності різних температурних режимів.

2.8. Ліофілізація штаму L. Pasteur

Культуру клітин ВНК-21 clone 13 заражали вірусом сказу штаму L. Pasteur із інфекційною активністю $(5,49 \pm 0,20)$ Іg CCID₅₀. У якості РС використовували DMEM («Biowest») із додаванням 0,5% СА ВРХ («Sigma-Aldrich»). Після очищення вірусної суспензії у зразки зібраного супернатанта вносили сахарозу («AppliChem», Німеччина) та желатин («Генезіс», Україна) в різних

концентраціях. Для ліофілізації вірусу використовували 4 варіанти захисних середовищ: 1 – РС + 5% сахарози; 2 – РС + 3% желатину та 5% сахарози; 3 – РС + 1% желатину та 5% сахарози; 4 – РС + 10% сахарози. Суспензію вірусу в зазначених захисних середовищах механічним дозатором зі змінним об'ємом («Biohit Proline Plus») вносили по 1 мл у стерильні скляні флакони та сублимували у ліофільній установці («VirTis», США). Вірус ліофілізували в умовах промислового виробництва за розробленим в АТ «БІОЛІК» технологічним регламентом для сублимації вірусних вакцин. Зразки заморожували на полицях камери сублимації до -49°C , сублимацію починали при -32°C та значеннях вакууму 209 Тор. Термін сублимації складав 16 годин, досушували 5 годин, загальний термін ліофілізації складав 67 годин. Залишкова вологість зразків складала 2–3%.

Після ліофілізації флакони зі зразками герметизували в повітряному середовищі гумовими пробками та алюмінієвими ковпачками, поміщали для зберігання при $(5\pm 1)^{\circ}\text{C}$ у холодильну камеру («National Lab», Німеччина), при (-20 ± 2) та $(-80\pm 5)^{\circ}\text{C}$ – в морозильні камери («National Lab»). Відновлення ліофілізованих зразків проводили внесенням у флакон 1 мл DMEM кімнатної температури. Вплив ліофілізації на ВС досліджували за допомогою визначення інфекційної активності вірусу до та після сублимації. Збереженість ліофілізованих препаратів вірусу оцінювали за інфекційною активністю через 6, 12, 18 и 24 місяці (термін спостереження) порівняно з активністю перед зберіганням та попереднім терміном зберігання. Оцінку зразків на всіх термінах зберігання також проводили за такими регламентними параметрами як зовнішній вигляд (структура, форма края та вид поверхні ліофілізату) [123] та час відновлення.

2.9. Статистичний аналіз результатів

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою комп'ютерних програм «Excel» («Microsoft», США) та «Statistica 10» («StatSoft», США). Визначали середні значення та стандартне відхилення від середнього значення. Перевірку розподілу даних на нормальність виконували за допомогою критерію

Шапіро-Уїлка. Використовували метод дисперсійного аналізу, за допомогою якого визначали значущість відмінностей між середніми значеннями інфекційної активності вірусу (one-way та factorial ANOVA) та оцінювали значущість впливу кожного з факторів на збереженість вірусу (main effects ANOVA). Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$ [206–213].

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ РЕЧОВИН ІЗ РІЗНИМИ МЕХАНІЗМАМИ КРІОЗАХИСНОЇ ДІЇ НА ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ВІРУСУ СКАЗУ ПРОТЯГОМ РОКУ ЗА ТЕМПЕРАТУР -20 ТА -80°C

Згідно з рекомендаціями ВООЗ і технічними умовами виробництва антирабічних препаратів за основу середовищ консервування у дослідженні було вибрано ростове середовище DMEM із додаванням ростового фактору (CA VPX). У якості кріопротекторних домішок були речовини, які входять за даними наукової та технічної літератури до складу захисних середовищ для консервування різних вірусів, бактерій, дріжджів.

Метою експериментів зі зберігання штамів CVS та L. Pasteur протягом року за низьких температур, результати яких представлені у цьому розділі, було порівняльне дослідження кріозахисної дії кріопротекторних домішок (сахарози, гліцерину, ДМСО, желатину, альгінату натрію та пептону) у різних концентраціях під час зберігання штамів вірусу сказу CVS та L. Pasteur за температур -20 та -80°C протягом року (термін спостереження). Отримані результати були використані для підбору захисних середовищ CVS та L. Pasteur BC за низьких температур в умовах виробництва антирабічних препаратів (розділ 4).

3.1. Інфекційна активність BC штамів CVS та L. Pasteur після інкубації за кімнатної температури з кріопротекторними домішками до середовищ консервування

Перед проведенням експериментів по дослідженню кріозахисної дії сахарози, гліцерину, ДМСО, желатину, альгінату натрію, пептону та мальтози було вивчено збереженість BC після інкубації в розчинах цих речовин в РС (табл. 3.1.1, 3.1.2). Зразки інкубували за кімнатної температури протягом 2-х годин. Встановлено, що двогодинна інкубація штамів BC CVS та L. Pasteur з 10%-ми розчинами сахарози, гліцерину, ДМСО, пептону, 3%-ми розчинами

желатину та альгілату натрію та 5%-м розчином мальтози не впливає на їх інфекційну активність.

Таблиця 3.1.1

Інфекційна активність штаму CVS після інкубації в розчинах кріопротекторних домішок у РС за кімнатної температури

Середовище консервування	Термін інкубації	Інфекційна активність, lg CCID ₅₀	% від контролю
Контроль РС	До інкубації	6,05±0,20	100,00
	2 год.	6,08±0,19*	100,50
РС + 10% сахарози	До інкубації	5,94±0,35	100,00
	2 год.	5,97±0,28*	100,50
РС + 10% гліцерину	До інкубації	6,04±0,15	100,00
	2 год.	6,00±0,12*	99,34
РС + 10% ДМСО	До інкубації	6,06±0,10	100,00
	2 год.	6,03±0,15*	99,50
РС + 10% пептону	До інкубації	6,12±0,18	100,00
	2 год.	6,05±0,16*	98,86
РС + 3% желатну	До інкубації	6,10±0,12	100,00
	2 год.	6,07±0,15*	99,51
РС + 3% альгілату натрію	До інкубації	6,07±0,12	100,00
	2 год.	6,03±0,15*	99,34
РС + 5% мальтози	До інкубації	4,84±0,15	100,00
	2 год.	4,81±0,12*	99,38

Примітка: * – інфекційна активність значуще не відрізняється від контролю ($p > 0,05$; $n = 5$).

Інфекційна активність штаму *L. Pasteur* після інкубації в розчинах
кріопротекторних домішок у РС за кімнатної температури

Середовище консервування	Термін інкубації	Інфекційна активність, lg CCID ₅₀	% від контролю
Контроль РС	До інкубації	7,27±0,16	100,00
	2 год.	7,23±0,16*	99,45
РС + 10% сахарози	До інкубації	7,22±0,15	100,00
	2 год.	7,18±0,20*	99,45
РС + 10% гліцерину	До інкубації	7,26±0,15	100,00
	2 год.	7,22±0,12*	99,45
РС + 10% ДМСО	До інкубації	7,25±0,15	100,00
	2 год.	7,25±0,19*	100,00
РС + 10% пептону	До інкубації	7,17±0,17	100,00
	2 год.	7,13±0,23*	99,44
РС + 3% желатну	До інкубації	7,29±0,08	100,00
	2 год.	7,22±0,09*	99,04
РС + 3% альгілату натрію	До інкубації	7,22±0,23	100,00
	2 год.	7,19±0,20*	99,58
РС + 5% мальтози	До інкубації	5,86±0,12	100,00
	2 год.	5,79±0,20*	98,81

Примітка: * – інфекційна активність значуще не відрізняється від контролю (p>0,05; n=5).

3.2. Вплив складу середовищ консервування і температурних режимів зберігання на інфекційну активність вірусу сказу штаму CVS

3.2.1. Вплив заморожування до -20 , -80°C та складу середовищ консервування на інфекційну активність вірусу сказу штаму CVS

У якості вихідного контролю використовували інфекційну активність вірусу у РС до охолодження (далі – вихідна інфекційна активність вірусу), яка становила $(6,01 \pm 0,16) \lg \text{CCID}_{50}$.

Було виявлено, що після охолодження зразків до 10°C та перенесення до морозильних камер із температурами -20 та -80°C та зберігання за цих температур протягом тижня інфекційна активність штаму CVS знизилась порівняно з вихідним контролем в усіх зразках, за винятком зразків з желатином (1 та 3%), заморожених до -80°C (рис. 3.2.1.1). Після заморожування до -80°C показники інфекційної активності вірусу у зразках з РС без домішок, з сахарозою (10%), гліцерином (7,5–10%), ДМСО (2,5–5%), желатином, альгінатом натрію (2%) та пептоном (2,5–10%) перевищували збереженість вірусу, замороженого до -20°C в аналогічних середовищах консервування. Найвищі показники збереженості вірусу після заморожування до -80°C були у зразках із РС із додаванням 1 та 3% желатину. Інфекційна активність вірусу у цих зразках становила $(6,03 \pm 0,08)$ та $(6,06 \pm 0,08) \lg \text{CCID}_{50}$ відповідно. Після заморожування до -20°C найвищі показники збереженості вірусу спостерігали у зразках із додаванням 2,5 та 5% сахарози, 1 та 3% желатину. Інфекційна активність вірусу у цих зразках становила $(5,72 \pm 0,10)$, $(5,70 \pm 0,10)$, $(5,75 \pm 0,10)$ та $(5,71 \pm 0,08) \lg \text{CCID}_{50}$ відповідно. Мінімальна збереженість вірусу після заморожування до -80°C була в зразках із РС із додаванням 1% альгінату натрію і становила $(5,25 \pm 0,09) \lg \text{CCID}_{50}$. Після заморожування до -20°C мінімальна збереженість вірусу була у зразках із РС із додаванням 10% пептону і становила $(3,36 \pm 0,08) \lg \text{CCID}_{50}$.

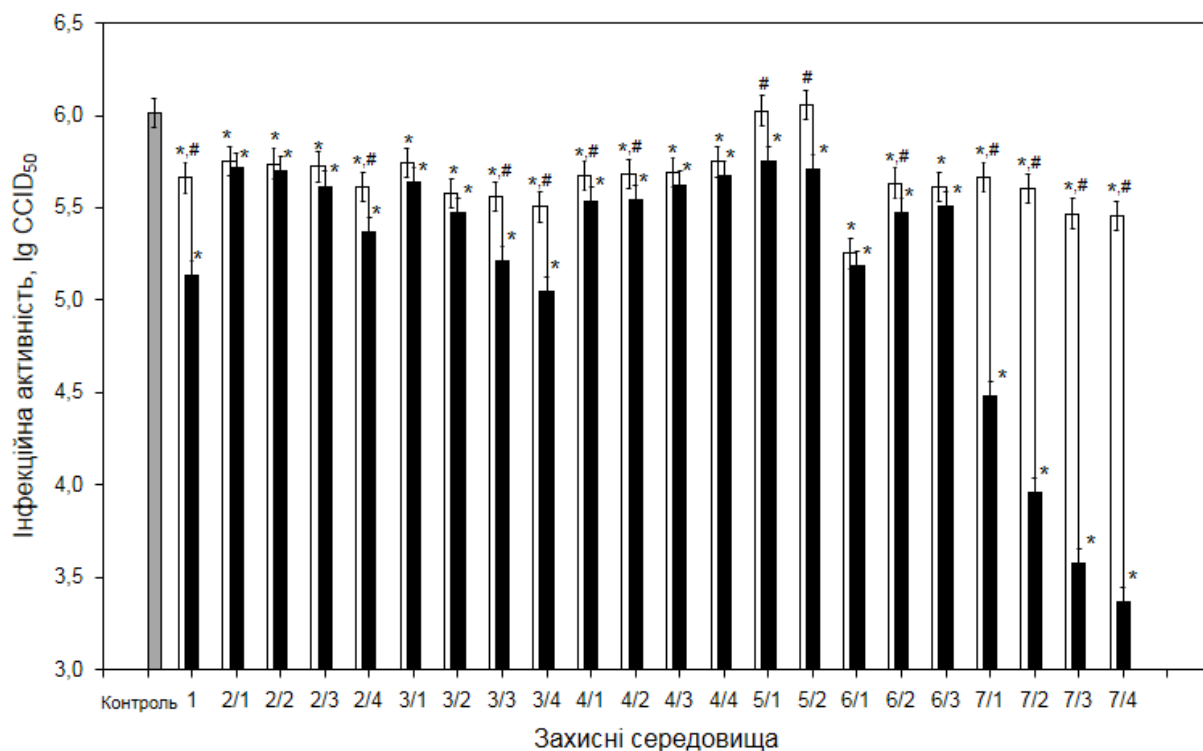


Рис. 3.2.1.1. Інфекційна активність стандартного штаму вірусу сказу CVS після заморожування в різних середовищах консервування і зберігання протягом тижня за різних температур: контроль (■); -80°C (□); -20°C (■).

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з температурою -20°C ($p < 0,05$; $n=5$).

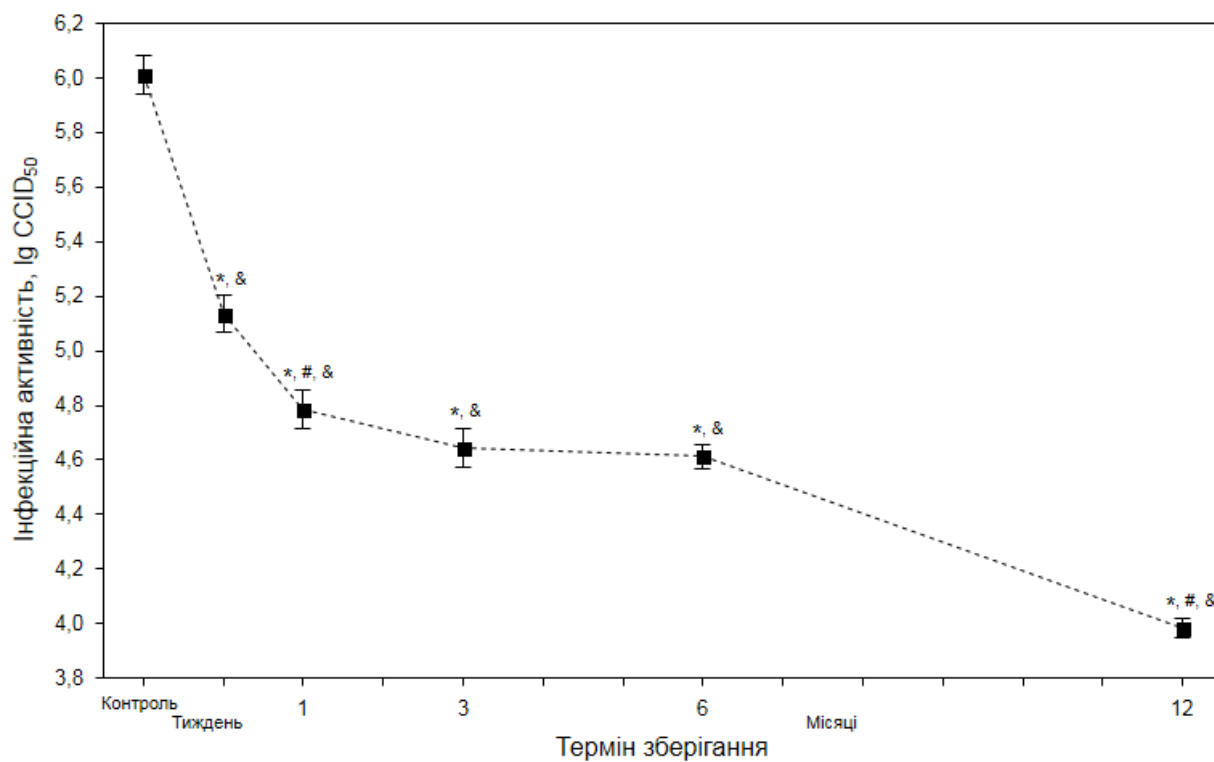
3.2.2. Динаміка інфекційної активності стандартного штаму вірусу сказу CVS під час зберігання протягом року у різних середовищах консервування за температур -20 та -80°C

Через 1 місяць зберігання за температури -20°C інфекційна активність вірусу у зразках із РС з сахарозою, гліцерином, ДМСО та желатином у всіх концентраціях була вище, ніж у зразках з РС без домішок (рис. 3.2.2.1–3.2.2.5). У середовищах з альгінатом натрію та пептоном інфекційна активність вірусу була нижчою. Після 3 місяців зберігання за цієї температури показники збереженості вірусу у середовищах з сахарозою (2,5–10%), гліцерином (2,5–5%), ДМСО (7,5%) та желатином (3%) були вищими за активність вірусу в РС без домішок. Через 6 місяців показники збереженості у середовищах з сахарозою, гліцерином, ДМСО (5–7,5%) та желатином (3%) були вищими за активність зразків з РС без домішок.

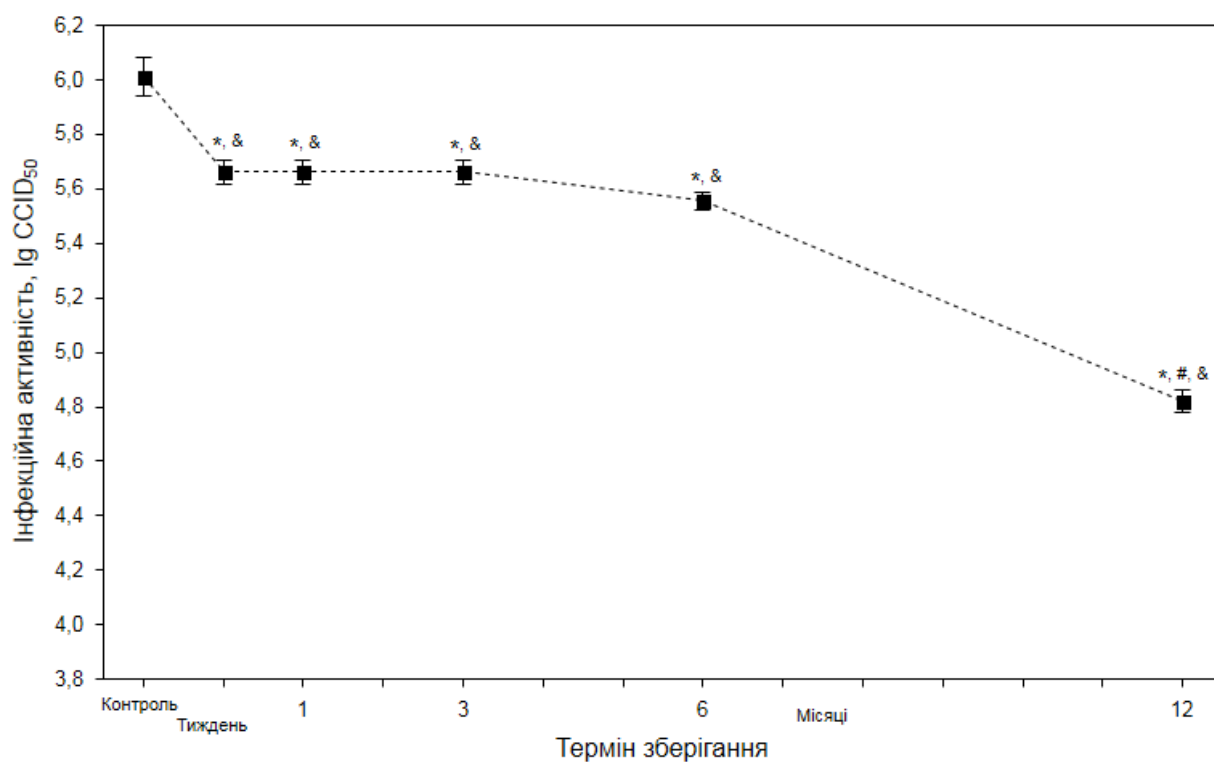
Після зберігання протягом 12 місяців показники інфекційної активності вірусу в зразках з сахарозою (5–10%) та желатином (3%) були вищими, ніж у середовищі 1. За температури -80°C через 1, 3 та 6 місяців зберігання інфекційна активність вірусу була вищою за РС без домішок у середовищах з желатином. Після зберігання протягом 12-ти місяців збереженість вірусу у РС без домішок перевищували показники збереженості вірусу у зразках із РС із додаванням сахарози (5–10%). За обох температур зберігання на всіх термінах спостереження пептон викликав часткову інактивацію вірусу.

Для розуміння механізмів захисної дії досліджених кріопротекторів був проведений аналіз динаміки зміни інфекційної активності вірусу протягом року зберігання за температур -20 та -80°C . Для цього були обрані середовища консервування, які забезпечували найвищі показники збереженості вірусу протягом 12-х місяців, а саме – РС без домішок та РС із додаванням сахарози, гліцерину, ДМСО та желатину.

В ході зберігання вірусу у РС без домішок при -20°C статистично значуще зниження його активності відбувалося протягом першого місяця після, а також між 6-м і 12-м місяцями (рис. 3.2.2.1). При -80°C інфекційна активність вірусу була стабільною до 6 місяців зберігання, а в подальшому знижувалась.



A

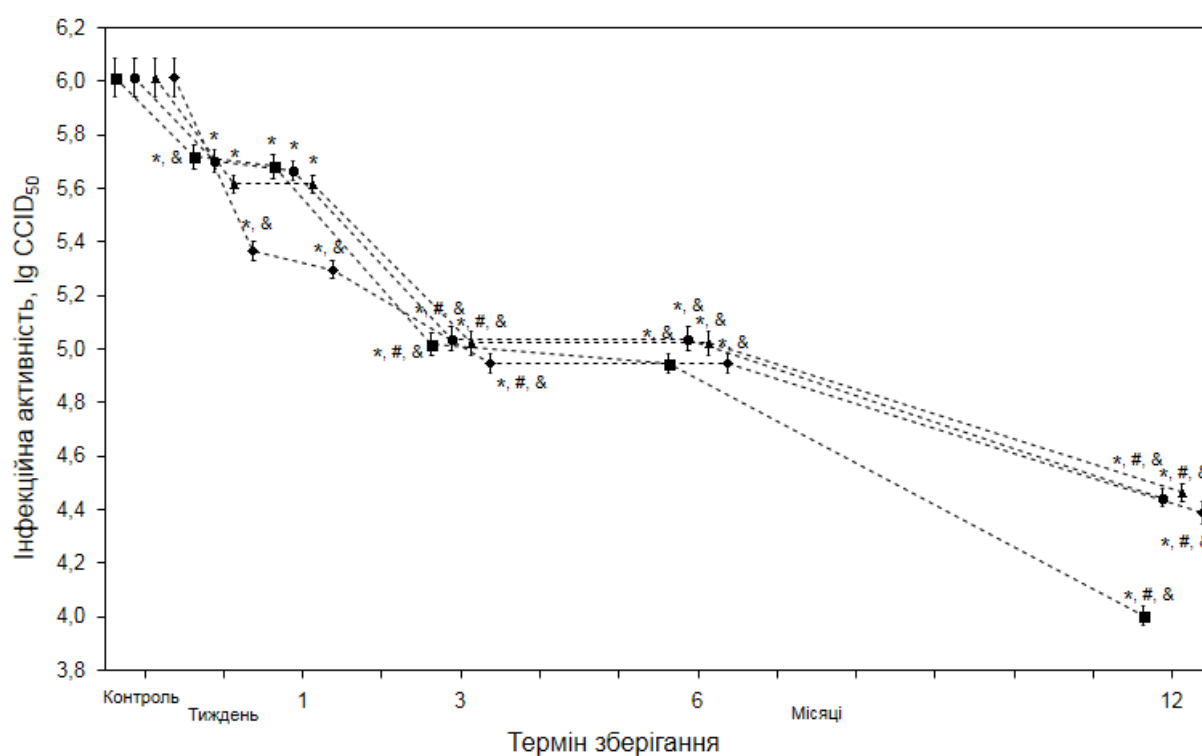


B

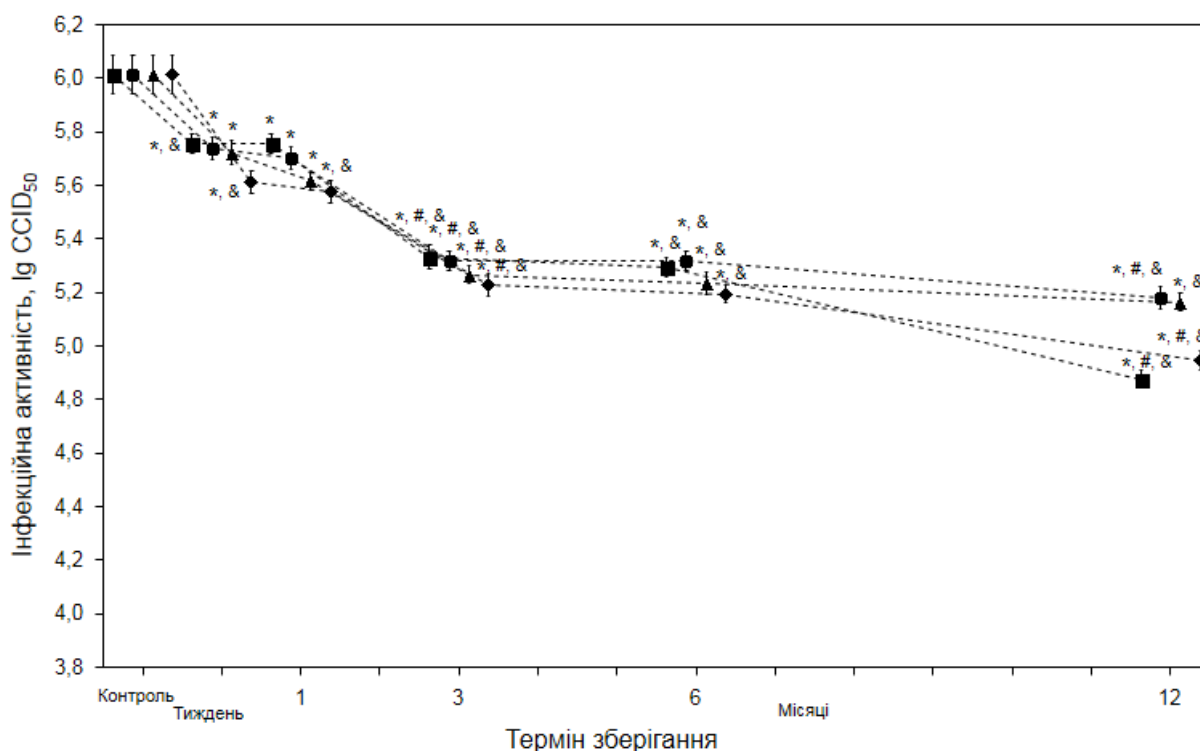
Рис. 3.2.2.1. Динаміка інфекційної активності стандартного штаму вірусу сказу CVS в ході зберігання за температур -20°C (A) та -80°C (B) у РС без домішок.

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання; & – відмінності статистично значущі між температурами -20 та -80°C ($p < 0,05$; $n=5$).

У свою чергу, в середовищах з сахарозою зниження інфекційної активності вірусу за температур -20 та -80°C відбувалося протягом перших трьох місяців (рис. 3.2.2.2). Між 3-м і 6-м місяцями інфекційна активність не змінювалась, а в подальшому знову знижувалась.



А

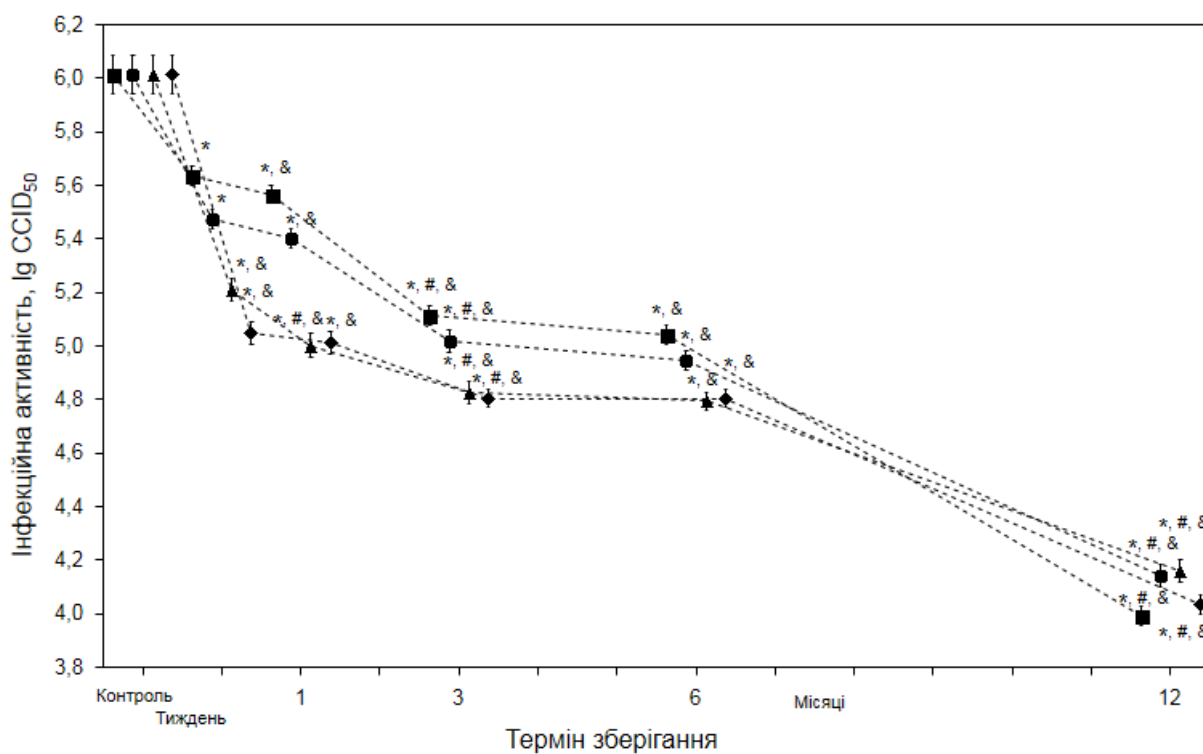


В

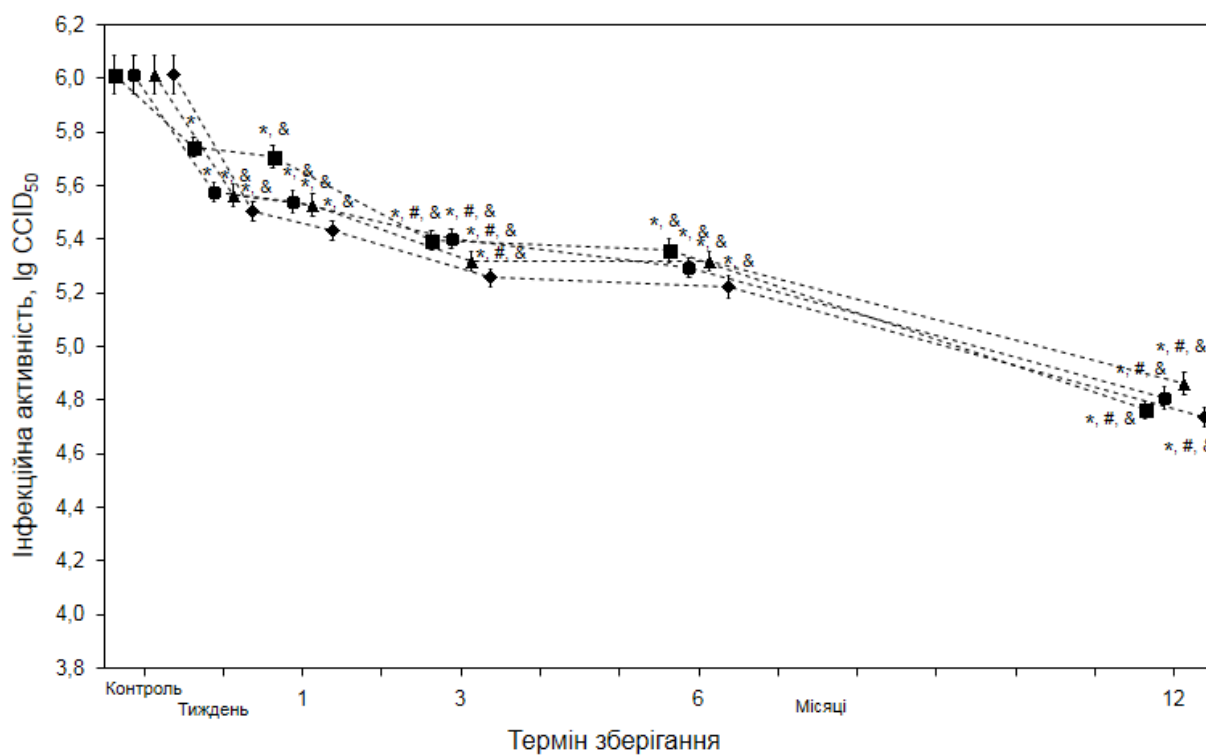
Рис. 3.2.2.2. Динаміка інфекційної активності стандартного штаму вірусу сказу CVS в ході зберігання за температур -20°C (А) та -80°C (В) у РС із додаванням сахарози: ■ – 2,5%; ● – 5%; ▲ – 7,5%; ◆ – 10%.

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання; & – відмінності статистично значущі між температурами -20 та -80°C ($p < 0,05$; $n=5$).

У середовищах консервування з гліцерином та ДМСО динаміка інфекційної активності вірусу в процесі зберігання була аналогічною зразкам у середовищах з сахарозою (рис. 3.2.2.3, 3.2.2.4). Зниження інфекційної активності відбувалося протягом перших 3-х місяців та між 6-м і 12-м місяцями зберігання.



A

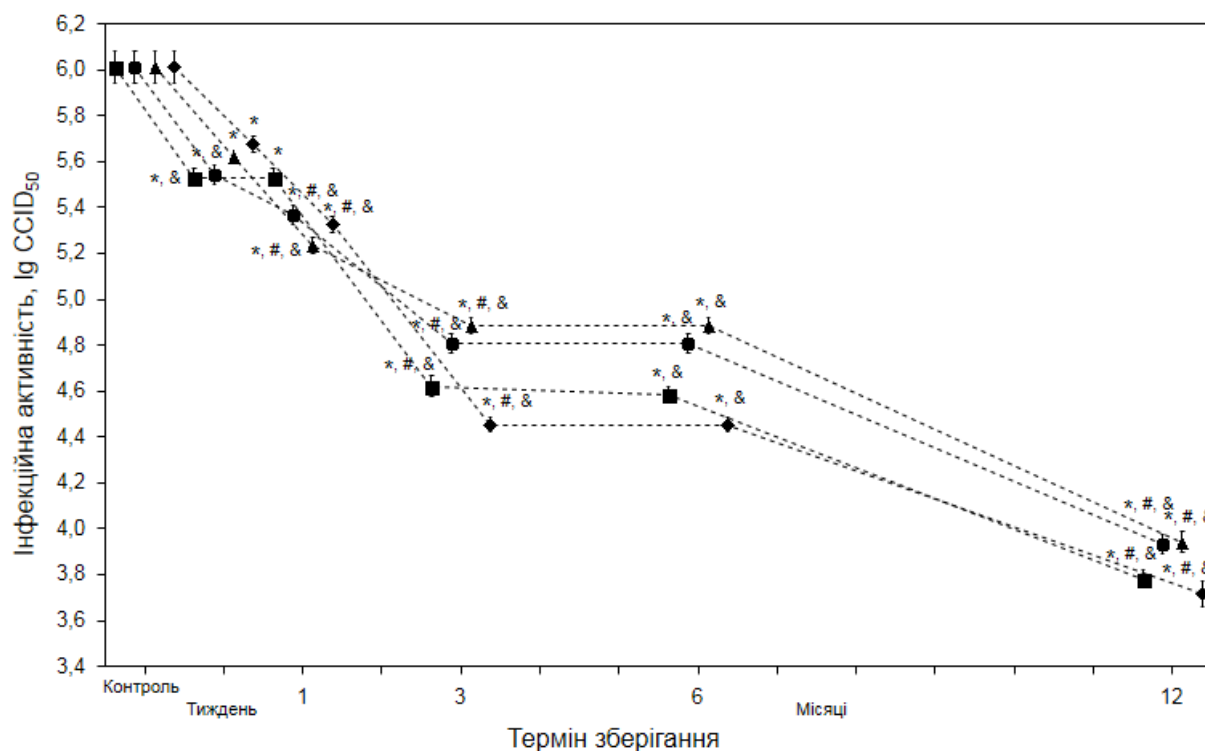


B

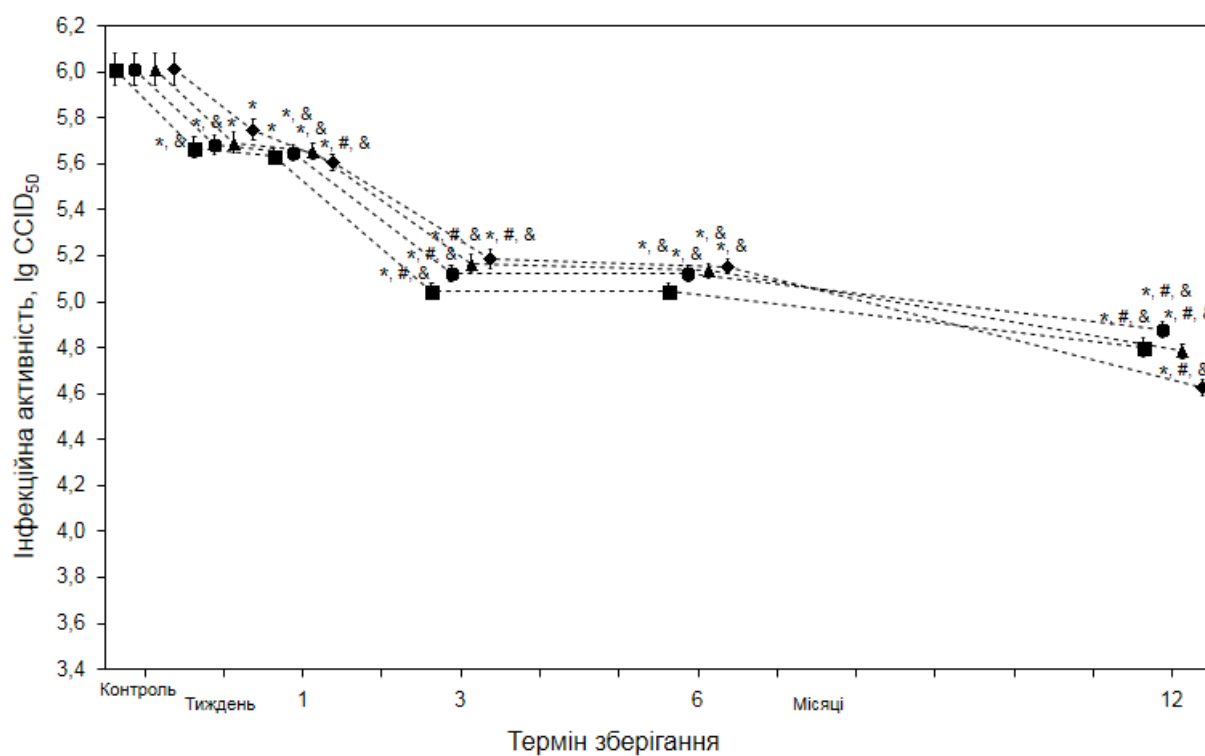
Рис. 3.2.2.3. Динаміка інфекційної активності стандартного штаму вірусу сказу CVS в ході зберігання за температур -20°C (A) та -80°C (B) у РС із додаванням гліцерину: ■ – 2,5%; ● – 5%; ▲ – 7,5%; ◆ – 10%.

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання;

& – відмінності статистично значущі між температурами -20 та -80°C ($p < 0,05$; $n=5$).



A

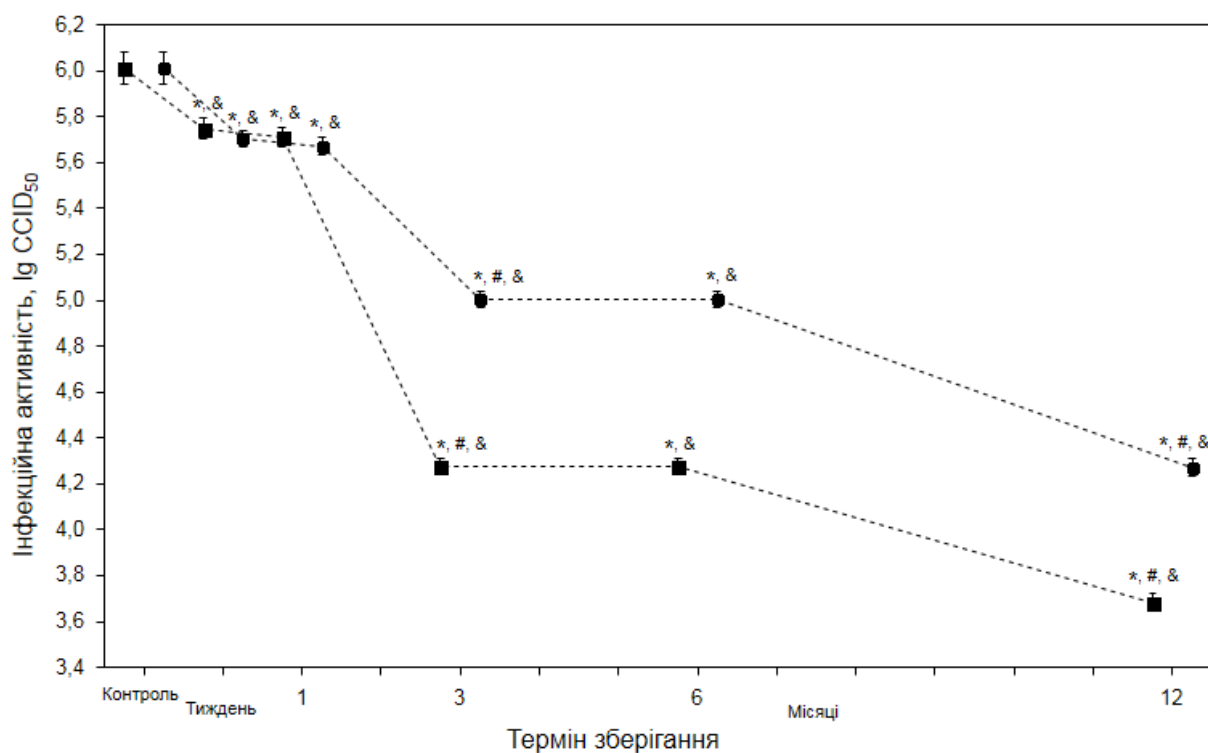


B

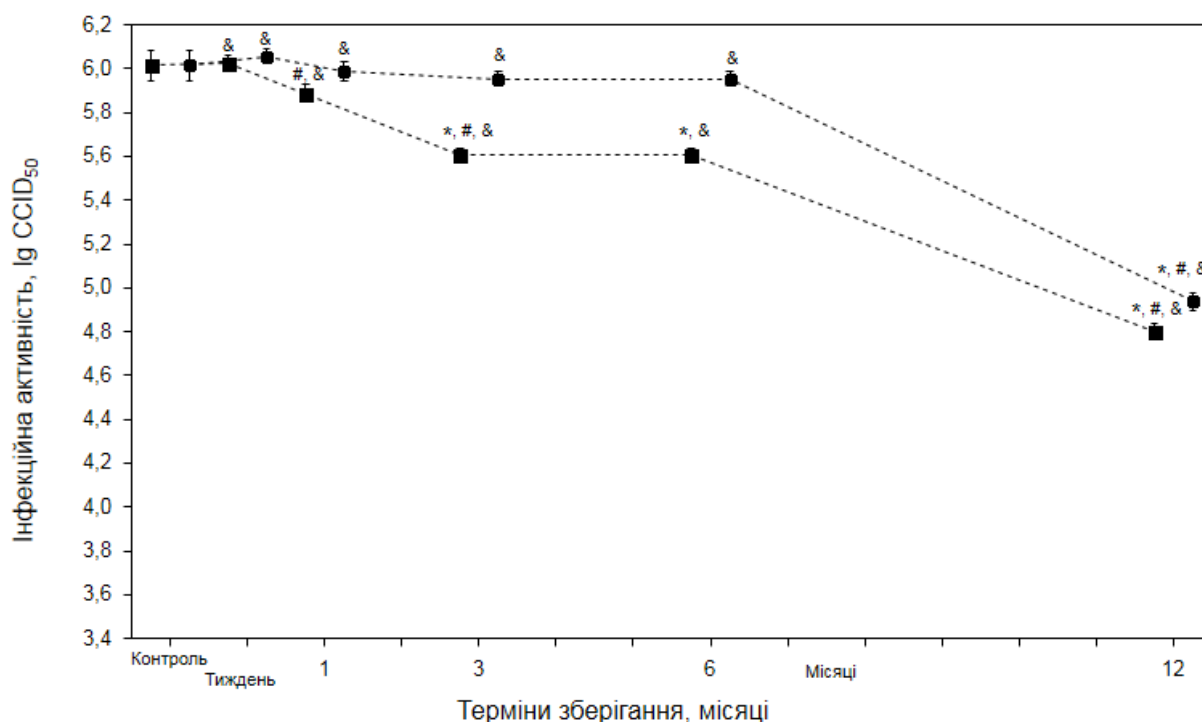
Рис. 3.2.2.4. Динаміка інфекційної активності стандартного штаму вірусу сказу CVS в ході зберігання за температур -20°C (A) та -80°C (B) у РС із додаванням ДМСО: ■ – 2,5%; ● – 5%; ▲ – 7,5%; ◆ – 10%.

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання; & – відмінності статистично значущі між температурами -20 та -80°C ($p < 0,05$; $n=5$).

Динаміка збереженості вірусу сказу штаму CVS у середовищах консервування із різними концентраціями желатину за температур -20 и -80°C була різною (рис. 3.2.2.5). У зразках з обома концентраціями желатину при -20°C та з 1% желатину при -80°C інфекційна активність вірусу знижувалась між 1-м і 3-м місяцями зберігання, у період між 3-м і 6-м місяцями – не змінювалась та знижувалась між 6-м і 12-м місяцями. У середовищі консервування з 3% желатину за температури -80°C інфекційна активність вірусу залишалась стабільною до 6-ти місяців зберігання, після чого знижувалась.



А



В

Рис. 3.2.2.5. Динаміка інфекційної активності стандартного штаму вірусу сказу CVS в ході зберігання за температур -20°C (А) та -80°C (В) у РС із додаванням желатину: ■ – 1%; ● – 3%.

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання; & – відмінності статистично значущі між температурами -20 та -80°C ($p < 0,05$; $n=5$).

В ході вивчення збереженості зразків вірусу сказу штаму CVS після зберігання у різних середовищах консервування за температур -20 та -80°C протягом 12-ти місяців (термін спостереження) оцінювали значущість внеску кожного з факторів (температура, термін зберігання та середовище консервування). Встановили, що в ході зберігання вірусу усі фактори різною мірою впливають на зміну інфекційної активності зразків: більший внесок робить температура зберігання, а потім – термін зберігання і середовище консервування.

Через 12 місяців при -20°C у РС без домішок (середовище 1) збереглося 66% від вихідної інфекційної активності вірусу (рис. 3.2.2.6). У зразках з 5–10% сахарози, 3% желатину та 5–7,5% гліцерину інфекційна активність вірусу була

значуще вище, ніж у середовищі 1 – 73–74, 71 та 69% від вихідного контролю відповідно. У зразках з 2,5% сахарози, 2,5 та 10% гліцерину та 5–7,5% ДМСО показники збереженості вірусу значуще не відрізнялися від показників збереженості у РС без домішок – 67, 66–67, 65–66% відповідно. У решті зразків (з додаванням 2,5 та 10% ДМСО, 1% желатину, альгінату натрію та пептону) інфекційна активність вірусу була нижче, ніж у РС без домішок. Найменші показники інфекційної активності вірусу були у середовищі із додаванням пептону – 10–19%.

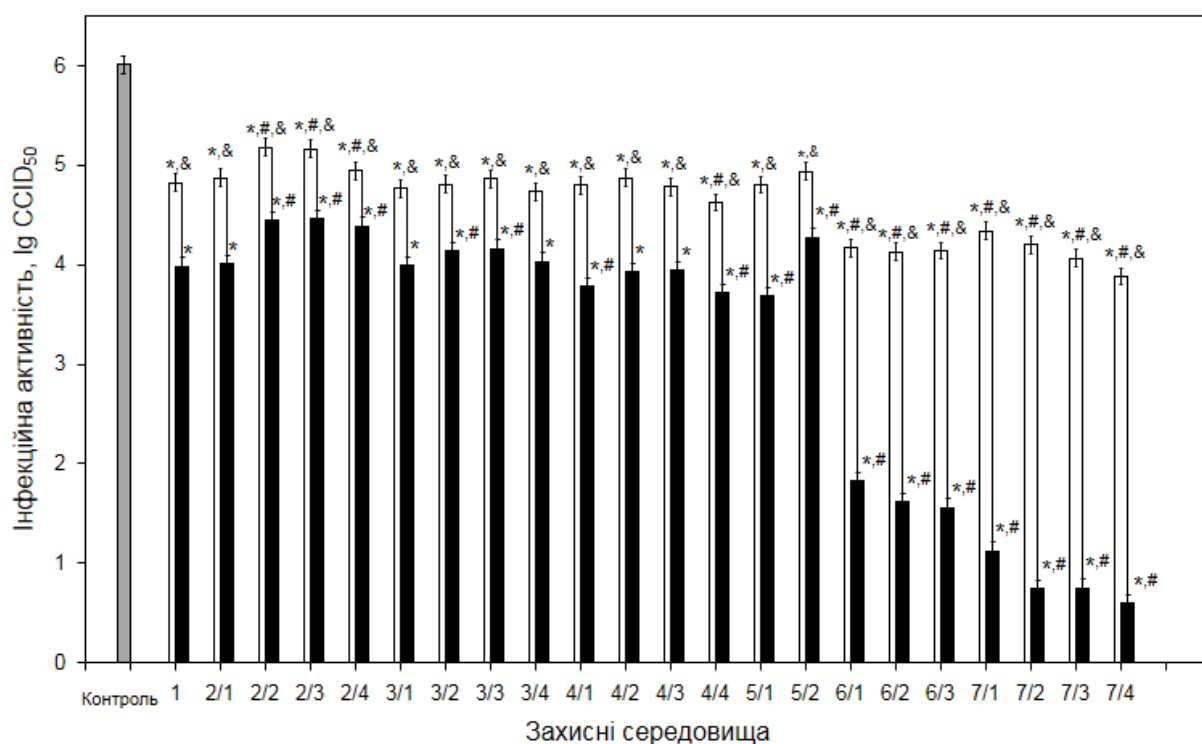


Рис. 3.2.2.6. Інфекційна активність стандартного штаму вірусу сказу CVS через 12 місяців зберігання в середовищах консервування за різних температур: контроль (□); -80°C (□); -20°C (■).

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з середовищем 1 за кожної із температур; & – відмінності статистично значущі порівняно з температурою -20°C ($p < 0,05$; $n = 5$).

Поряд із цим, при -80°C через 12 місяців у РС без домішок збереглося 80% від вихідної активності вірусу. Значуще більш високі показники активності забезпечували тільки зразки з 5–10% сахарози – 82–86% від вихідного контролю.

У зразках з 2,5% сахарози, гліцерином, 2,5–7,5% ДМСО та желатином показники збереженості вірусу не відрізнялись від РС без домішок та складала, відповідно, 81, 79–81, 80–81 та 80–82%. В інших середовищах (з 10% ДМСО, альгінатом натрію та пептоном) інфекційна активність вірусу була значуще нижче, ніж у зразках з РС без домішок, та складала 77, 69 и 65–72% відповідно. Слід зазначити, що в інтервалі між 1-м і 12-м місяцями зберігання показники інфекційної активності вірусу, що зберігався при -80°C , значуще перевищували активність вірусу, що зберігався при -20°C .

3.3. Вплив складу середовищ консервування і температурних режимів зберігання -20 , -80°C на інфекційну активність вірусу сказу штаму *L. Pasteur*

3.3.1. Вплив складу середовищ консервування та заморожування до -20 , -80°C на інфекційну активність вірусу сказу штаму *L. Pasteur*

Як і в попередніх розділах дослідження у якості вихідного контролю також використовували інфекційну активність вірусу у РС до охолодження (далі – вихідна інфекційна активність вірусу), яка становила $(7,23 \pm 0,10) \lg \text{CCID}_{50}$.

Після заморожування до -20°C та зберігання за цієї температури протягом тижня інфекційна активність вірусу в усіх зразках знизилась порівняно із вихідним контролем та показниками інфекційної активності в зразках, заморожених до -80°C (рис. 3.3.1.1). Після заморожування до -80°C у зразках із додаванням 1 та 2% альгінату натрію інфекційна активність вірусу не змінювалася. У всіх інших зразках інфекційна активність вірусу була нижчою за значення вихідного контролю та вищою за показники інфекційної активності вірусу у зразках, заморожених до -20°C . Винятком були зразки із РС із додаванням 10% сахарози, в яких інфекційна активність вірусу, замороженого до -20 та -80°C , не відрізнялась. Мінімальні показники збереженості вірусу після заморожування до -20 та -80°C були у РС із додаванням 7,5 та 10% пептону.

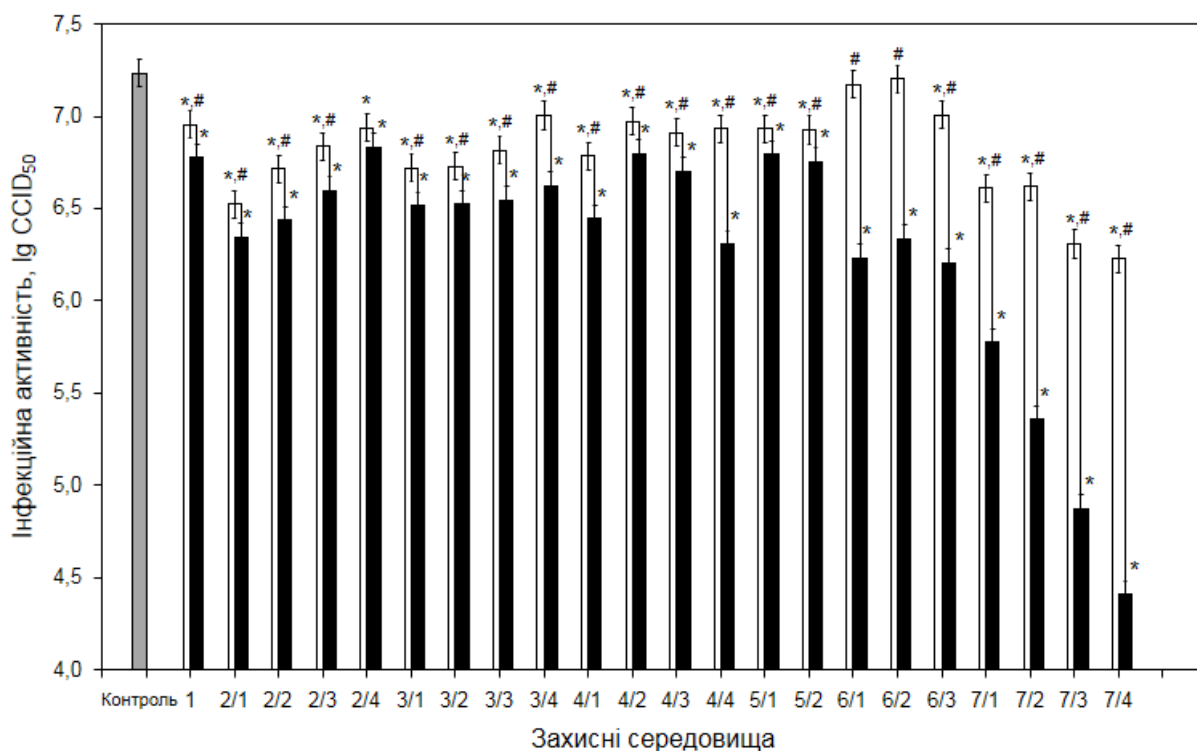


Рис. 3.3.1.1. Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur після заморожування в середовищах консервування і зберігання протягом тижня за різних температур: контроль (□); -80°C (▒); -20°C (■).

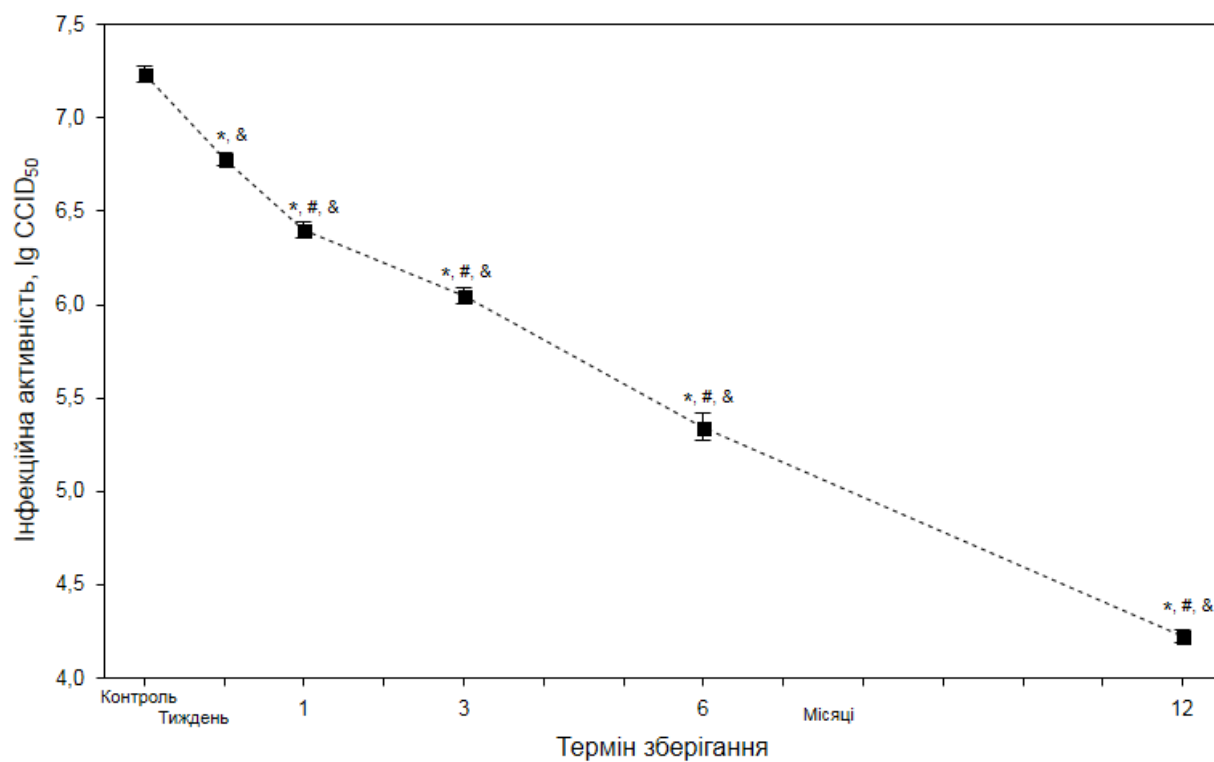
Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з температурою -20°C ($p < 0,05$; $n=5$).

3.3.2. Динаміка інфекційної активності вірусу сказу штаму L. Pasteur під час зберігання протягом року у різних середовищах консервування

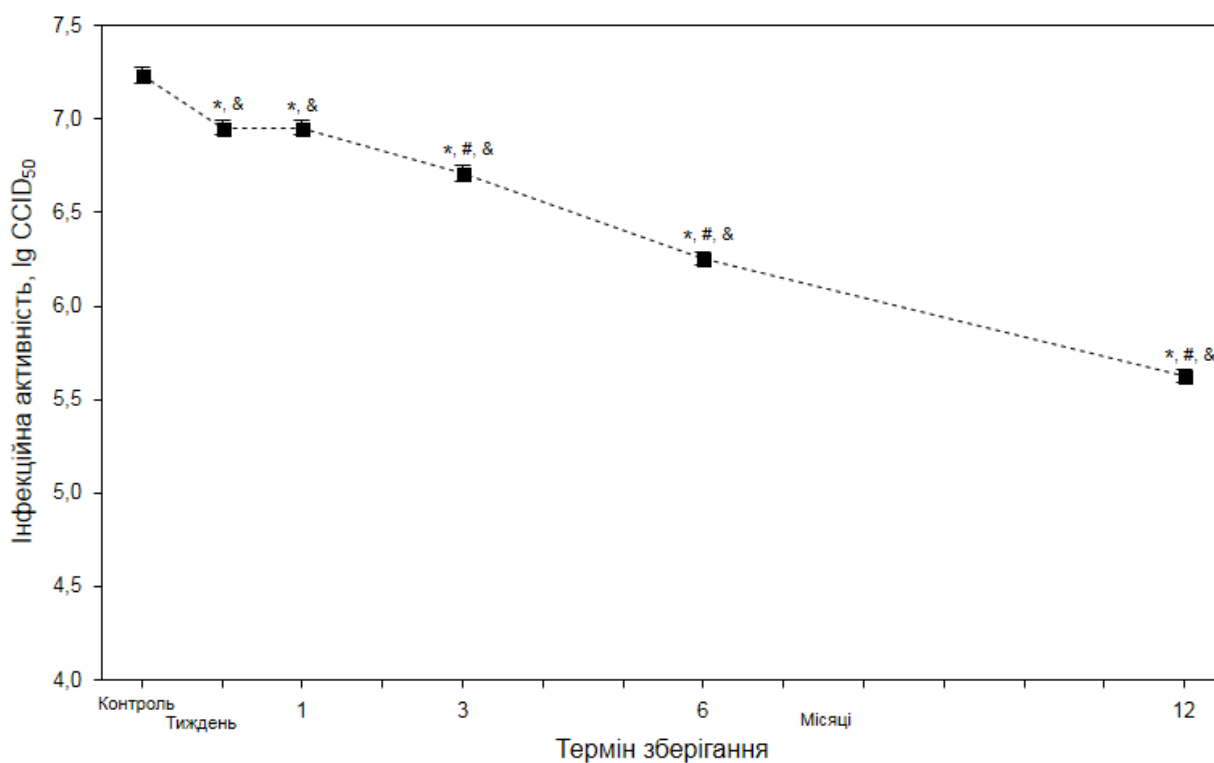
Через 1 місяць зберігання за температури -20°C інфекційна активність вірусу в середовищах з 10% гліцерину (середовище 3/4) та з желатином (середовища 5/1 та 5/2) була вищою за середовище 1 (РС без домішок). У решті зразків показники збереженості вірусу були нижче. Через 3 місяці більш високу збереженість порівняно з середовищем 1 забезпечували зразки з 7,5 та 10% сахарози (середовища 2/3 та 2/4), 5–10% гліцерину (середовища 3/2–3/4) та желатином (середовища 5/1 та 5/2). Через 6 місяців аналогічну ефективність показали зразки з сахарозою, гліцерином, ДМСО та желатином в усіх досліджених концентраціях. Через 12 місяців інфекційна активність вірусу, який зберігався у середовищах з сахарозою та гліцерином в усіх досліджених

концентраціях (середовища 2/1–2/4, 3/1–3/4) та ДМСО у концентрації 5% (середовище 4/2), була вище, ніж у РС без домішок. За температури -80°C через 1 місяць зберігання в усіх досліджених середовищах показники збереженості були нижчими за середовище 1. Через 3 місяці значуще більш високу збереженість порівняно з цим середовищем забезпечували середовища із додаванням 5% ДМСО, 3% желатину та 2% альгінату натрію (середовища 4/2, 5/2, 6/2); через 6 місяців – з 7,5 та 10% сахарози (середовища 2/3 та 2/4), гліцерином, ДМСО, желатином та альгінатом натрію в усіх досліджених концентраціях. Через 12 місяців інфекційна активність вірусу в зразках з 5–10% сахарози та 3% желатину (середовища 2/2–2/4 та 5/2) була вище, ніж у середовищі 1. На всіх термінах зберігання інфекційна активність вірусу, що зберігався при -80°C , була вищою за таку при -20°C .

Для аналізу динаміки зміни інфекційної активності вірусу сказу штаму L. Pasteur були обрані середовища консервування з найвищими показниками збереженості через 12 місяців за обох температур зберігання, а саме – РС без домішок, із додаванням сахарози, гліцерину, ДМСО та желатину. При цьому оцінювали значущість відмінностей інфекційної активності вірусу в порівнянні з попереднім терміном зберігання в інтервалі між 1-м тижнем і 12-м місяцями. В ході зберігання вірусу у РС без домішок при -20°C значуще зниження його активності відбувалося на всіх термінах зберігання (рис. 3.3.2.1). При -80°C активність вірусу була стабільною до 1 місяця зберігання, проте знижувалася при подальшому його зберіганні.



А



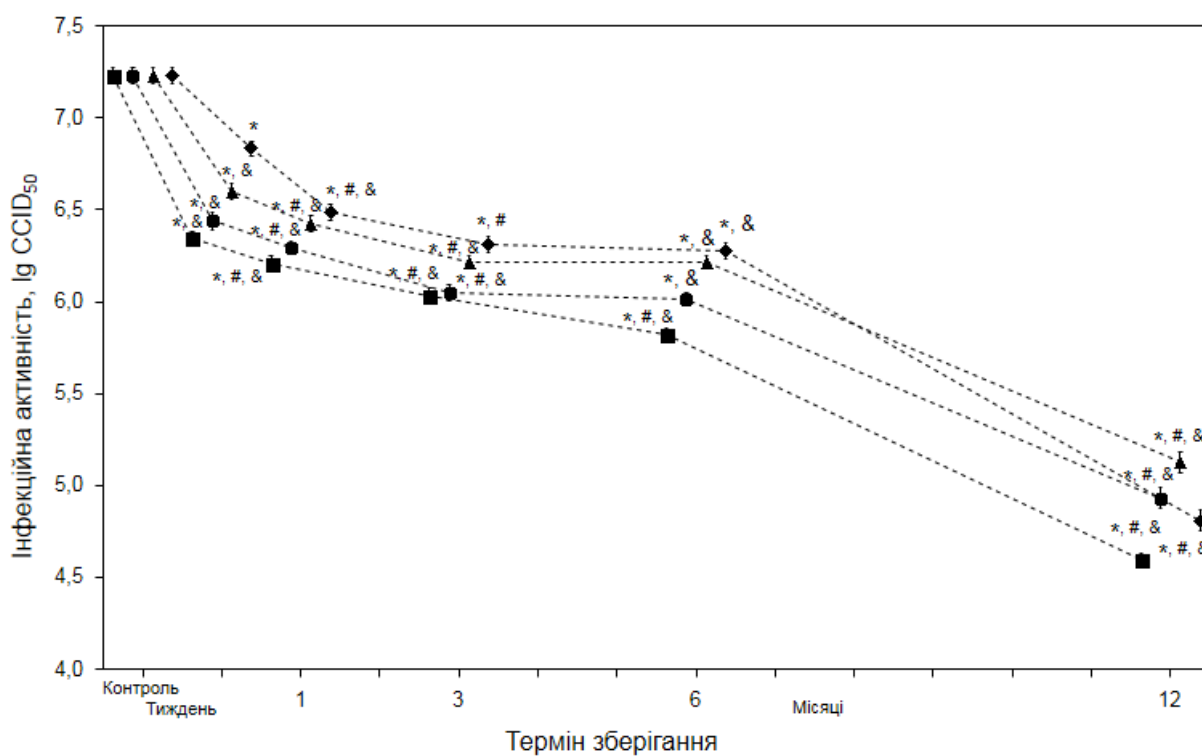
В

Рис. 3.3.2.1. Динаміка інфекційної активності вірусу сказу штаму L. Pasteur в ході зберігання за температур -20°C (А) та -80°C (В) у РС без домішок.

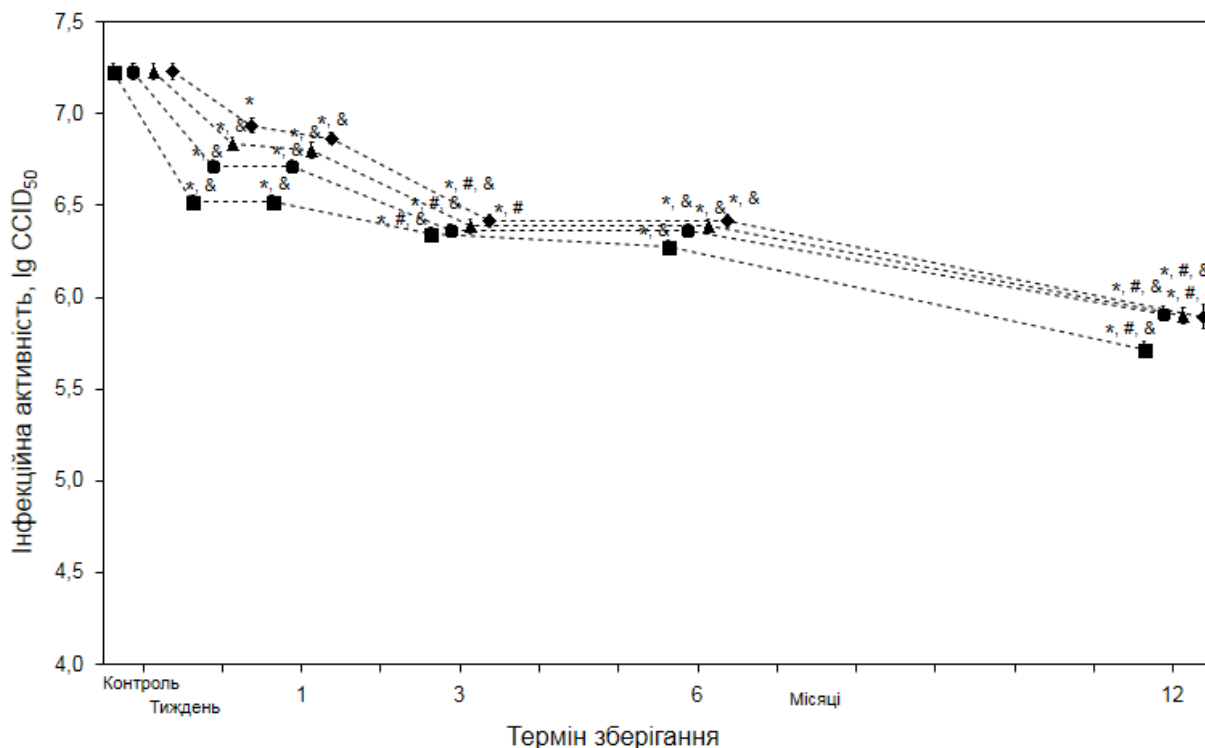
Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання;

& – відмінності статистично значущі між температурами -20 та -80°C ($p < 0,05$; $n=5$).

В процесі зберігання вірусу в середовищах з сахарозою при -20°C значуще зниження його активності відбувалося протягом перших трьох місяців (рис. 3.3.2.2). Між 3-м і 6-м місяцями показники інфекційної активності вірусу, крім зразків з 2,5% сахарози, залишалися стабільними. У зразках з 2,5% сахарози відбувалася часткова інактивація вірусу. Між 6-м і 12-м місяцями зберігання в усіх зразках з сахарозою відбувалося подальше зниження активності. В ході зберігання вірусу при -80°C у середовищах з сахарозою значуще зниження інфекційної активності відбувалося між 1–3 та 6–12 місяцями зберігання.



А



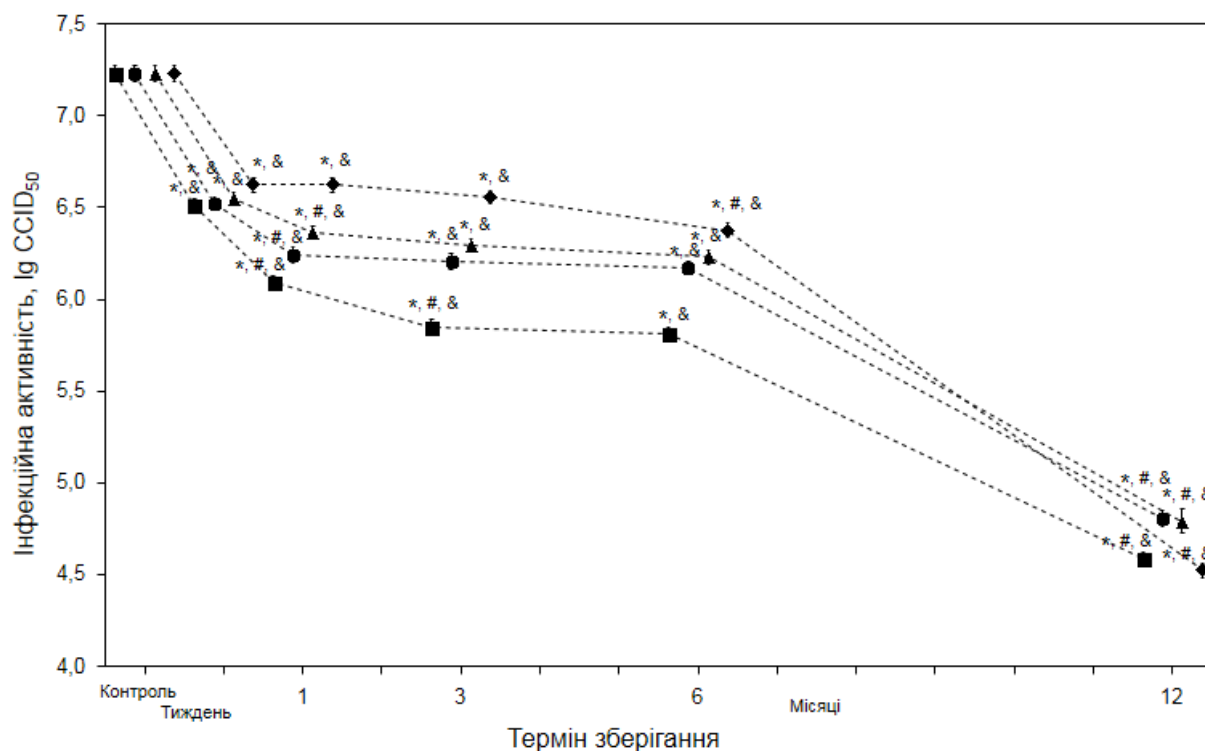
В

Рис. 3.3.2.2. Динаміка інфекційної активності вірусу сказу штаму L. Pasteur в ході зберігання за температур -20°C (А) та -80°C (В) у РС із додаванням сахарози: ■ – 2,5%; ● – 5%; ▲ – 7,5%; ◆ – 10%.

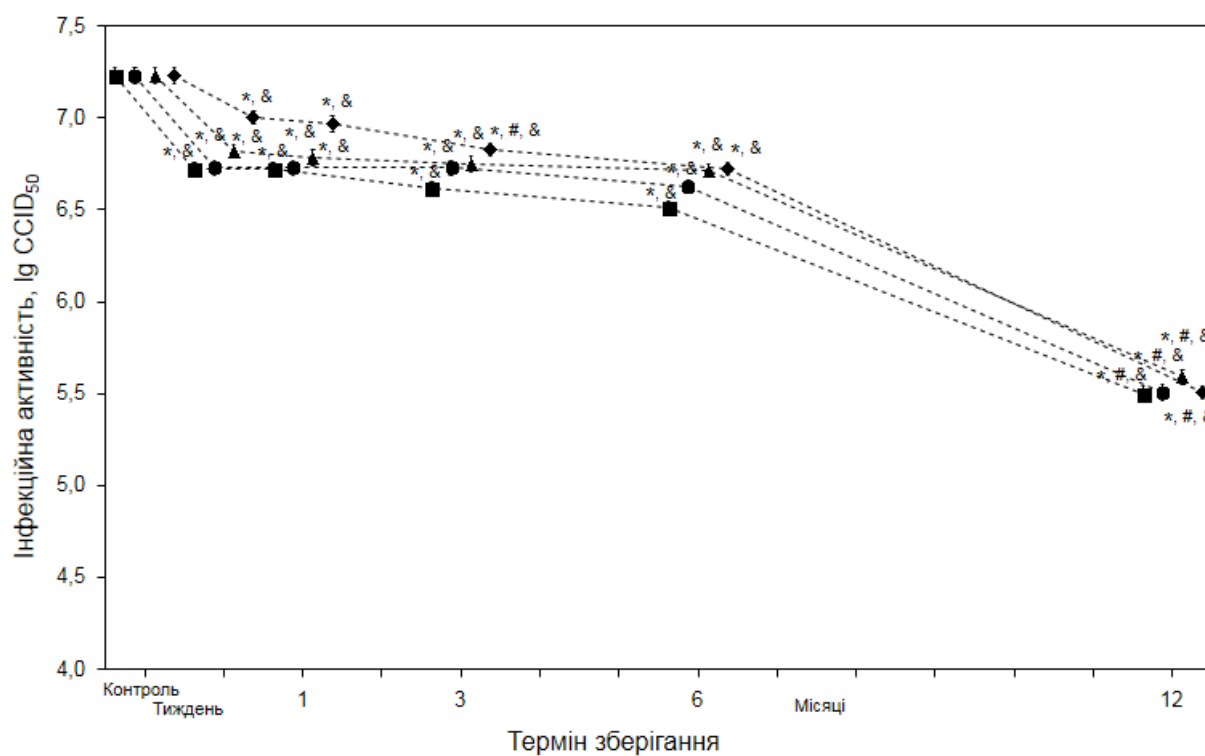
Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання; & – відмінності статистично значущі між -20 та -80°C ($p < 0,05$; $n = 5$).

Під час зберігання вірусу в середовищах консервування з гліцерином при -20°C протягом одного місяця зберігання в усіх зразках, за винятком зразків з 10% гліцерину, відбувалося зниження інфекційної активності (рис. 3.3.2.3). Між 1-м і 3-м місяцями зберігання в даних умовах відбулося подальше зниження інфекційної активності вірусу в зразках з 2,5% гліцерину. Між 3-м і 6-м місяцями зниження інфекційної активності відбувалося в зразках з 10% гліцерину. Між 6-м і 12-м місяцями значуще зниження інфекційної активності вірусу відбулося в усіх середовищах. В ході зберігання вірусу протягом місяця при -80°C його активність залишалася стабільною в середовищах з усіма дослідженими концентраціями гліцерину. Між 1-м і 3-м місяцями в даних умовах інфекційна активність вірусу знижувалася в середовищі з 10% гліцерину, а між 3-м і 6-м місяцями вона

залишалася стабільною. Між 6-м і 12-м місяцями зберігання активність вірусу знижувалась в усіх зразках.



А

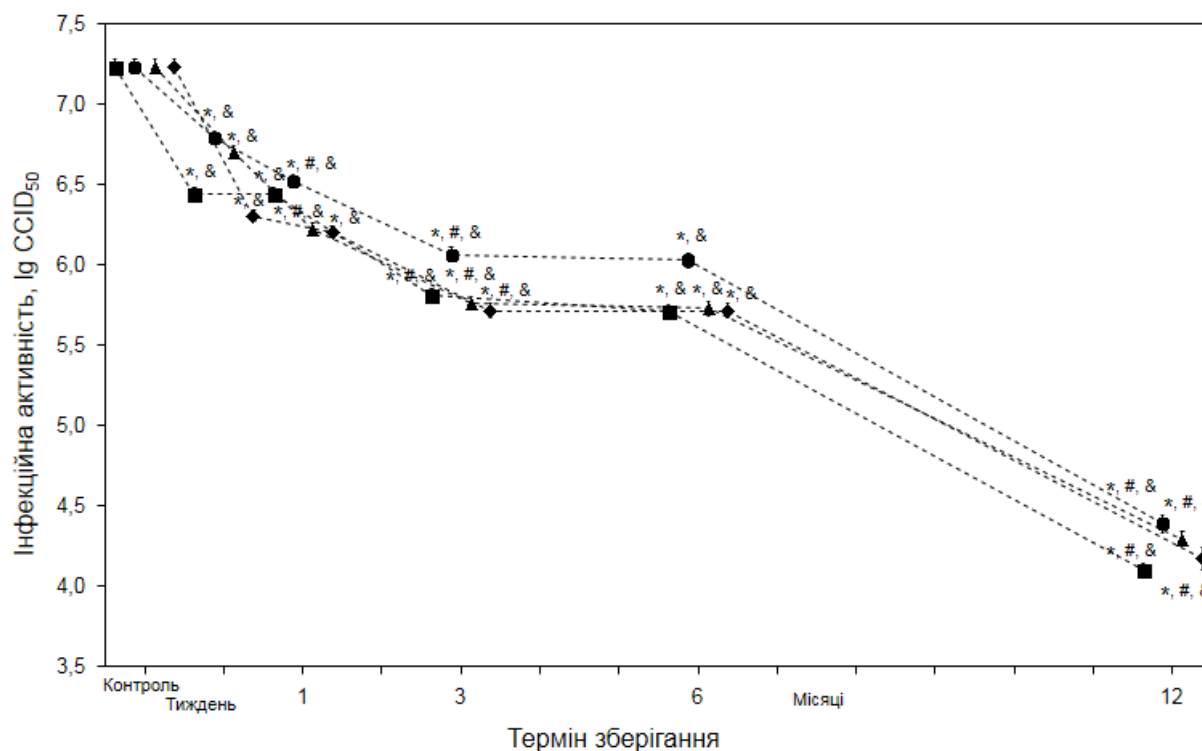


В

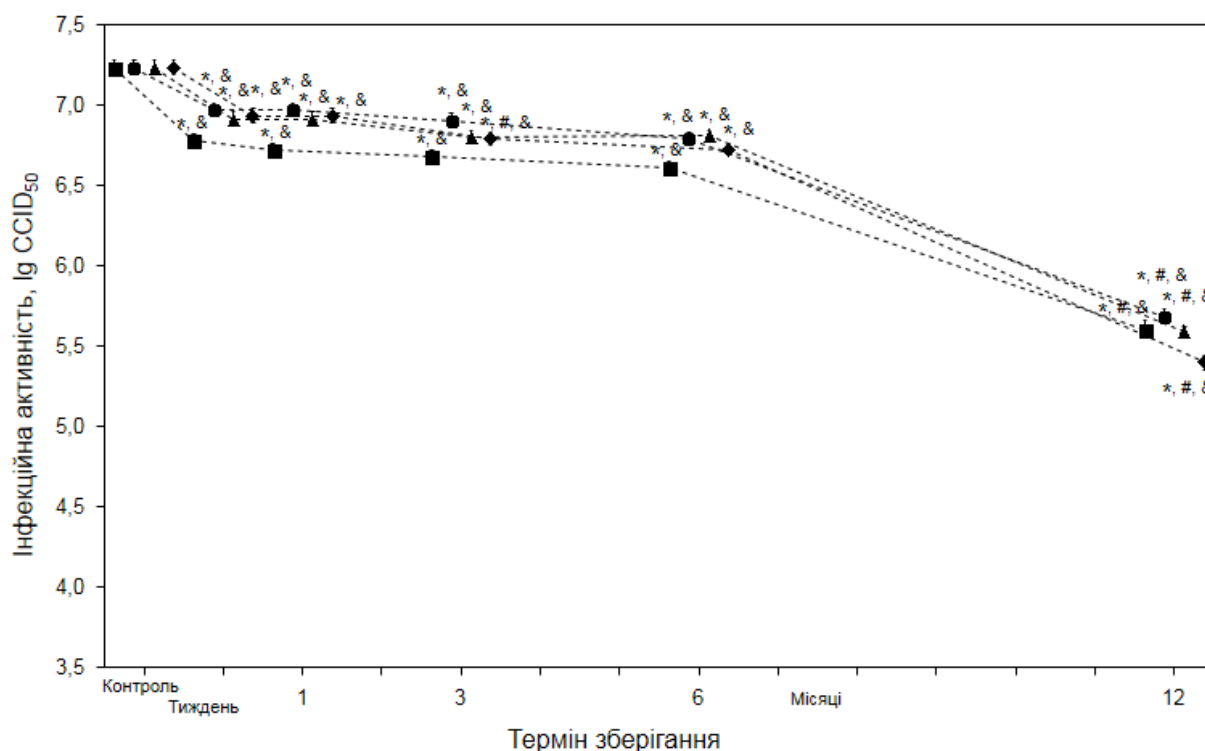
Рис. 3.3.2.3. Динаміка інфекційної активності вірусу сказу штаму L. Pasteur в ході зберігання за температур -20°C (А) та -80°C (В) у РС із додаванням гліцерину: ■ — 2,5%; ● — 5%; ▲ — 7,5%; ◆ — 10%.

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання; & – відмінності статистично значущі між температурами -20 та -80°C ($p < 0,05$; $n=5$).

В ході зберігання вірусу в середовищах консервування з ДМСО при -20°C через місяць активність вірусу знизилася в зразках з 5 та 7,5% ДМСО, через 3 місяці – у всіх зразках (рис. 3.3.2.4). Між 3-м і 6-м місяцями зберігання інфекційна активність не змінювалася, а в період між 6-м і 12-м місяцями – знижувалася у всіх зразках. Під час зберігання при -80°C аналогічно вищеописаним середовищам за даної температури протягом місяця інфекційна активність вірусу залишалася стабільною в усіх зразках. Між 1-м і 3-м місяцями її зниження відбулося в середовищі з 10% ДМСО. Між 3-м і 6-м місяцями активність залишалася стабільною в усіх середовищах з ДМСО, однак, в період між 6-м і 12-м місяцями показники збереженості вірусу знизилися в усіх зразках.



A

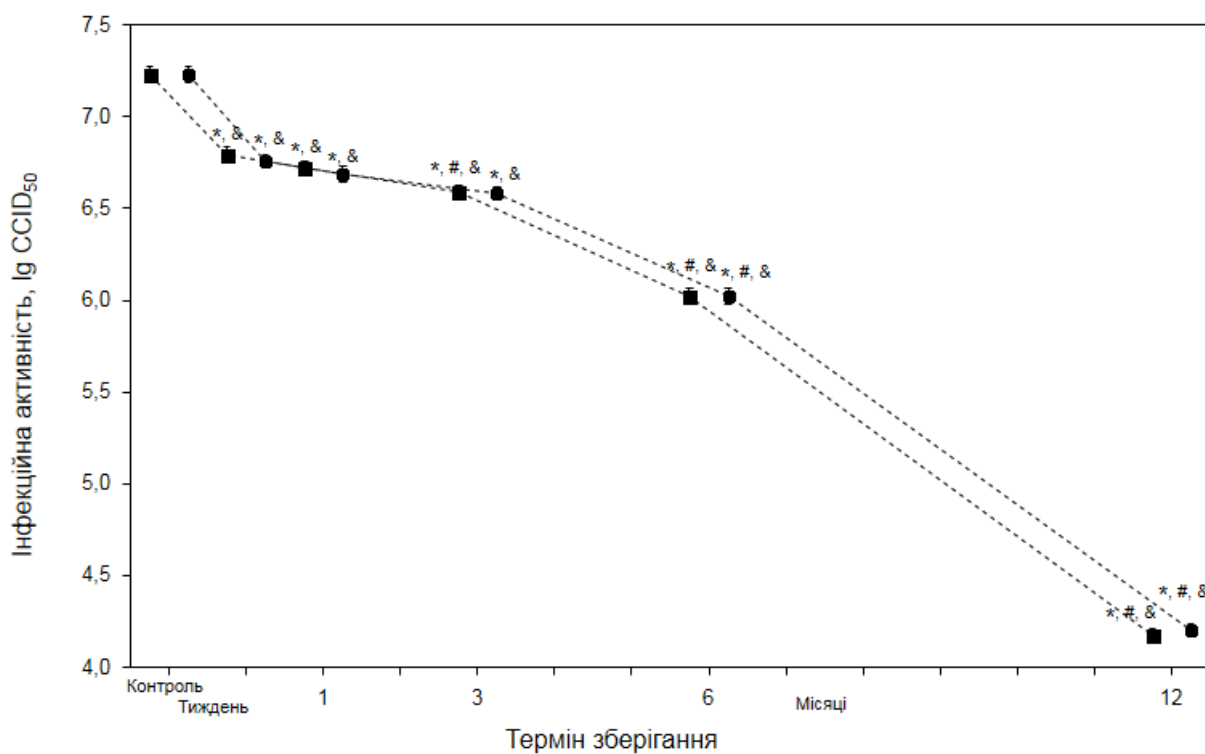


В

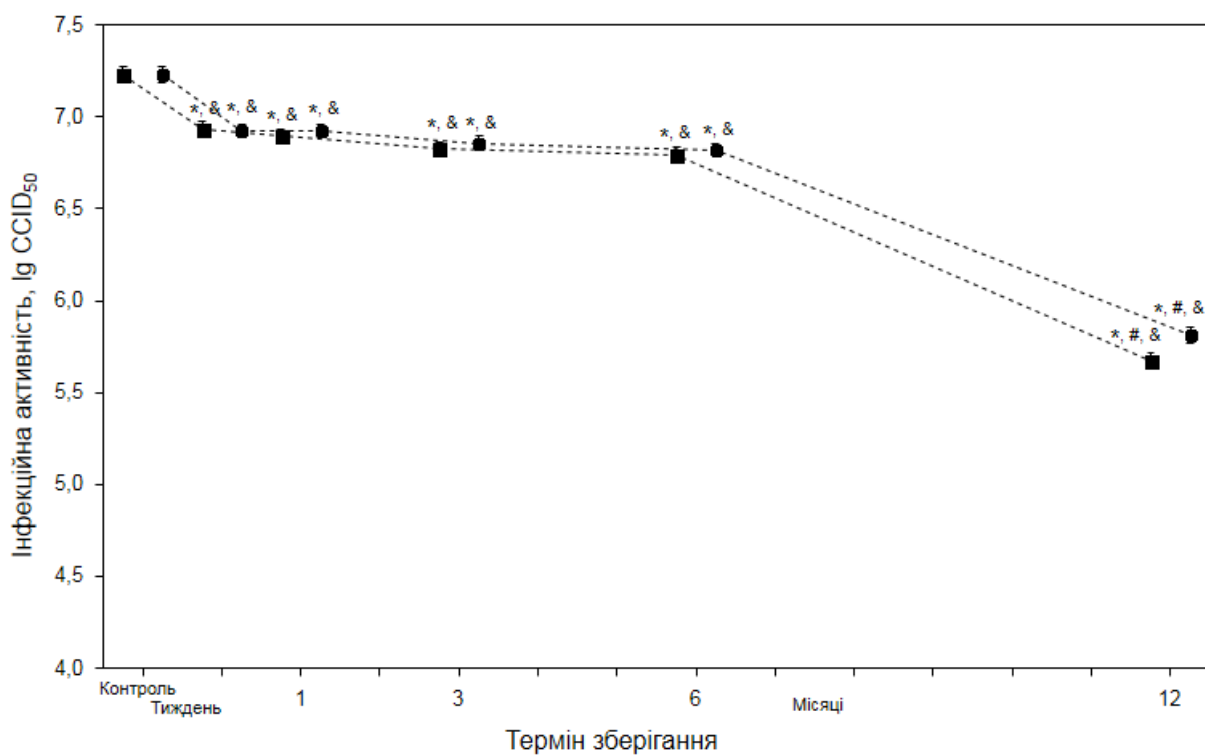
Рис. 3.3.2.4. Динаміка інфекційної активності вірусу сказу штаму L. Pasteur в ході зберігання за температур -20°C (А) та -80°C (В) у РС із додаванням ДМСО: ■ – 2,5%; ● – 5%; ▲ – 7,5%; ◆ – 10%.

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання; & – відмінності статистично значущі між температурами -20 та -80°C ($p < 0,05$; $n=5$).

У середовищі з 1% желатину за температури -20°C активність вірусу залишалася стабільною до 1-го місяця, а в середовищі з 3% желатину – до 3-х місяців зберігання, після чого знижувалася до кінця терміну спостереження (рис. 3.3.2.5). За температури -80°C інфекційна активність вірусу в зразках з желатином не змінювалася протягом 6-ти місяців, після чого знижувалась до кінця терміну спостереження.



А



В

Рис. 3.3.2.5. Динаміка інфекційної активності вірусу сказу штаму L. Pasteur в ході зберігання за температур -20°C (А) та -80°C (В) у РС із додаванням желатину: ■ – 1%; ● – 3%.

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання;

& – відмінності статистично значущі між температурами -20 та -80°C ($p < 0,05$; $n=5$).

В ході вивчення збереженості вірусу сказу штаму L. Pasteur після зберігання у різних середовищах консервування за температур -20 та -80°C протягом 12-ти місяців (термін спостереження) оцінювали значущість внеска кожного з факторів (температура, термін зберігання та середовище консервування). Встановили, що в ході зберігання вірусу усі фактори різною мірою впливають на зміну інфекційної активності зразків: більший внесок робить температура зберігання, а потім – термін зберігання і середовище консервування.

Через 12 місяців зберігання за температури -20°C у РС без домішок (середовище 1) збереглося 58% від вихідної інфекційної активності вірусу (рис. 3.3.2.6). У зразках з сахарозою, гліцерином та 5% ДМСО активність вірусу була значуще вище, ніж у середовищі 1 – 64–71, 63–67 та 61% від вихідного контролю відповідно. У зразках з 7,5–10% ДМСО та желатином показники збереженості вірусу значуще не відрізнялися від показників збереженості у РС без домішок – 59, 58 та 58% відповідно. У решті зразків (з додаванням 2,5% ДМСО, альгінату натрію та пептону) інфекційна активність вірусу була нижче, ніж у РС без домішок. Найменші показники інфекційної активності вірусу були у середовищі із додаванням пептону – 7–14%. Поряд із цим, при -80°C через 12 місяців у РС без домішок збереглося 78% від вихідної активності вірусу. Значуще більш високі показники активності забезпечували тільки зразки з 5–10% сахарози та 3% желатину, 81–82, 80% від вихідного контролю відповідно. У препаратах з 2,5 та 10% гліцерину, 10% ДМСО, альгінатом натрію та пептоном інфекційна активність вірусу була значуще нижче, ніж у зразках з РС без домішок, та складала 76, 76, 75, 70–72, 69–72% відповідно. У решті зразків (2,5% сахарози, 5–7,5% гліцерину, 2,5–7,5% ДМСО та 1% желатину) показники збереженості вірусу не відрізнялись від РС без домішок. В інтервалі між 1-м і 12-м місяцями зберігання показники інфекційної активності вірусу, що зберігався при -80°C , значуще перевищували активність вірусу, що зберігався при -20°C .

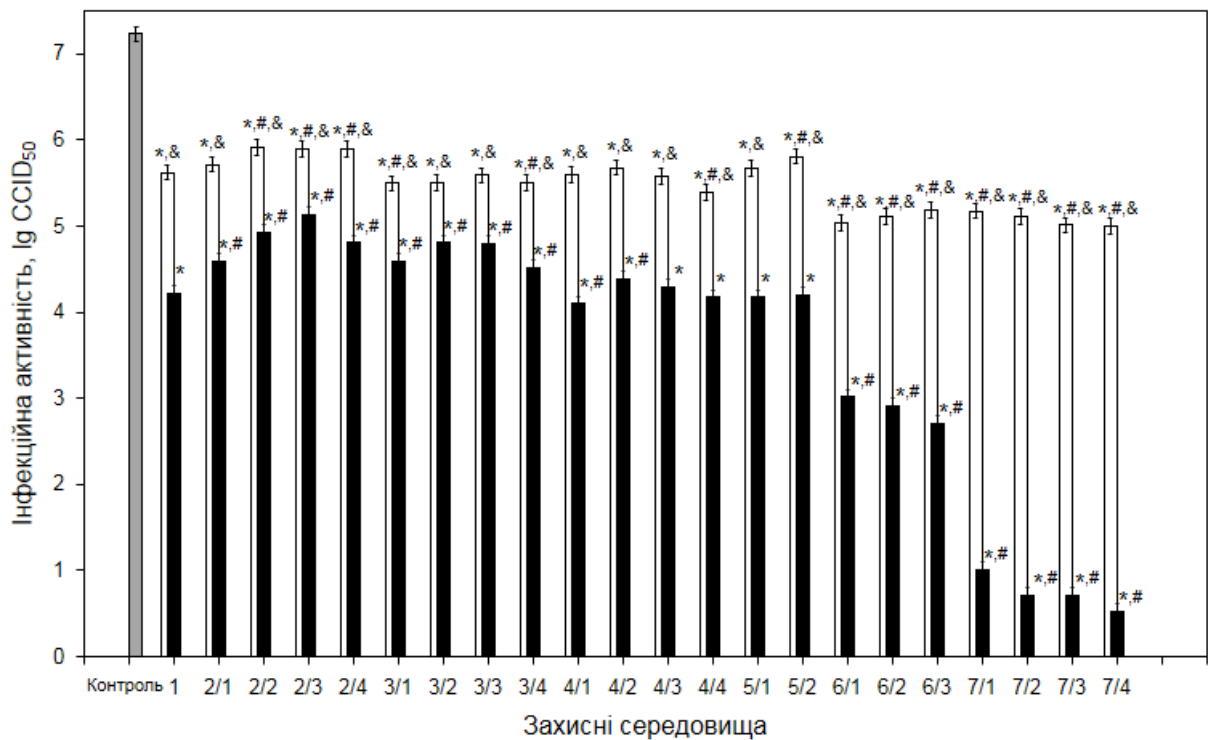


Рис. 3.3.2.6. Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur через 12 місяців зберігання в середовищах консервування за різних температур: контроль (■); -80°C (□); -20°C (■).

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з середовищем 1 за кожної із температур; & – відмінності статистично значущі порівняно з температурою -20°C ($p < 0,05$; $n=5$).

Результати експериментів, які наведено у розділі 3, свідчать про наступне. Під час зберігання за температури -20°C виявлена різниця в збереженості інфекційної активності штамів CVS та L. Pasteur, суспендованих у РС без додавання кріопротекторних домішок. Після етапу заморожування до -20°C більш висока збереженість була у зразках із штамом L. Pasteur – 94% від вихідної інфекційної активності, у зразках зі штамом CVS – 85%. Після етапу зберігання протягом 12-ти місяців за температури -20°C , навпаки, більш висока збереженість була у зразках зі штамом CVS – 66%, а у зразках зі штамом L. Pasteur – 58%. Відповідно, інфекційна активність штаму CVS знизилася за 12 місяців на 19%, штаму L. Pasteur – на 36%. За температури -80°C показники збереженості обох штамів після етапів заморожування і наступного зберігання не відрізнялися.

Додавання до РС кріопротекторних домішок, які проявляли захисну дію під час низькотемпературного зберігання різних вірусів, бактерій та дріжджів, під час заморожування і зберігання ВС штамів CVS та L. Pasteur за температур -20 і -80°C показало різну дію.

На етапі охолодження до -20°C штаму CVS виражену захисну дію проявили сахароза, гліцерин, ДМСО, желатин та альгінат натрію. Якщо після заморожування до -20°C у РС збереглося 85% активності штаму CVS, то після додавання у середовище 2,5–10% в середньому збереглося 93% активності вірусу; 2,5–10% гліцерину – 89%; 2,5–10% ДМСО – 93%; 1–3% желатину – 95,5%; 1–3% альгінату натрію – 89,7% активності вірусу. В процесі зберігання штаму CVS при -20°C протягом 12-ти місяців вираженість захисної дії деяких груп кріопротекторних домішок змінилася. Як вказано вище, у РС через 12 місяців збереглося 66% активності вірусу. Цей показник перевищували середні показники збереженості вірусу в середовищах із додаванням сахарози (72%) і гліцерину (67,75%). У зразках із додаванням 1–3% желатину збереженість вірусу була такою ж, як і в РС – 66%. У зразках із додаванням 2,5–10% ДМСО та 1–3% альгінату натрію середні показники збереженості вірусу були нижче, ніж у РС – 64 та 27,7% відповідно. В процесі зберігання за -20°C протягом 12-ти місяців інактивувалися у РС 19% віріонів, у середовищі із додаванням сахарози – 21%; гліцерину – 21,25%; ДМСО – 29%; желатину – 29,5%; альгінату натрію – 62% відповідно.

На етапі заморожування до -20°C середні показники збереженості штаму L. Pasteur у середовищах із додаванням різних кріопротекторних домішок не перевищували збереженість вірусу, який охолоджували у РС без домішок. У РС після заморожування збереглося 94% вихідної інфекційної активності вірусу, у РС із додаванням 2,5–10% сахарози – 90,5%; 2,5–10% гліцерину – 90,75%; 2,5–10% ДМСО – 90,75%; 1–3% желатину – 93,5%; 1–3% альгінату натрію – 86,7%. Інактивувалися на етапі заморожування до -20°C у РС 36% віріонів, у середовищах із додаванням сахарози – 23%; гліцерину – 26%; ДМСО – 32%; желатину – 35,5%; альгінату натрію – 46,6% віріонів.

Пептон у концентраціях 2,5–10% виказував виражену інактивуючу дію на ВС як на етапі заморожування, так і на етапі зберігання за температури -20°C . Після заморожування середні показники збереженості штаму CVS становили 64,25%, штаму L. Pasteur – 70,5%. Після зберігання протягом 12-ти місяців при -20°C збереглося 13,25% активності штаму CVS і 10,25% активності штаму L. Pasteur. Кількість інактивованих віріонів становила 61 і 60,25% відповідно.

Під час зберігання ВС за температури -80°C різниця між показниками збереженості після етапу заморожування і етапу зберігання була меншою, кріопротекторні домішки до РС показували більш виражений захисний ефект на цьому етапі. Після заморожування до -80°C у РС без домішок збереглося 94% вихідної інфекційної активності штаму CVS. Після заморожування до цієї температури у РС із додаванням сахарози середній показник збереженості вірусу становив 94,5%; гліцерину – 93,5%; ДМСО – 95%; желатину – 100%; альгілату натрію – 91,3%; пептону – 92,25%. Після зберігання при -80°C протягом 12-ти місяців у РС збереглося 80% інфекційної активності штаму CVS. У середовищах із додаванням сахарози збереглося 83,75%; гліцерину – 79,75%; ДМСО – 79,5%; желатину – 81%; альгілату натрію – 69%; пептону – 68,75%. Інактивувалися під час зберігання при -80°C у РС 14% віріонів, у середовищі із додаванням сахарози – 11%; гліцерину – 13,75%; ДМСО – 15,5%; желатину – 19,5%; альгілату натрію – 22,3% пептону – 23,5%.

На етапі заморожування до -80°C у РС без домішок збереглося 96% вихідної інфекційної активності штаму L. Pasteur. Середній показник збереженості цього штаму у середовищах з сахарозою складав 93,5%; гліцерину – 94,25%; ДМСО – 95,5%; желатину – 96%; альгілату натрію – 98,7%; пептону – 89%. Через 12 місяців за температури -80°C у РС без домішок збереглося 78% вихідної інфекційної активності штаму L. Pasteur. У середовищах із додаванням сахарози збереглося 81% активності вірусу; гліцерину – 76,25%; ДМСО – 77%; желатину – 79,5%; альгілату натрію – 71%; пептону – 70,25%. Інактивувалися під час зберігання у РС без домішок 18% віріонів, у середовищах із додаванням сахарози

– 12,5%; гліцерину – 18%; ДМСО – 18,5%; желатину – 16,5%; альгілату натрію – 27,7%; пептону – 18,75%.

Враховуючи проведений аналіз кріопротекторної дії не кожного середовища консервування з 22-х досліджених, а хімічних груп домішок до РС можна зробити наступні висновки. Під час зберігання за температур -20 , -80°C на ВС чинять пошкоджувальну дію температурний фактор, фізико-хімічні фактори, пов'язані з процесами кристалізації води на етапах охолодження до -20 , -80°C , та фізико-хімічні фактори, які впливають на ВС за цих температур протягом 12-ти місяців зберігання і які теж пов'язані з фазовим станом води за цих температур. При цьому у ряді зразків вираженість захисної дії різних груп хімічних речовин залежить і від особливостей ультраструктурної організації віріонів штамів CVS і L. Pasteur. Кріопротекторну дію проявляє і РС, яке було основою всіх середовищ консервування.

За результатами експериментів, результати яких представлені у розділі 3, були відібрані найбільш ефективні кріопротектори та їх концентрації для подальших експериментів з урахуванням вимог виробничих регламентів. В подальших експериментах було також вивчено кріозахисну дію мальтози, яку рекомендовано додавати у якості стабілізатора у антирабічні вакцини [73].

За матеріалами розділу 3 опубліковані роботи [214–226].

Отримано патент України на корисну модель [227].

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРНИХ РЕЖИМІВ ЗБЕРІГАННЯ, СКЛАДУ ЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ І ТЕРМІНІВ ЗБЕРІГАННЯ НА ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ВІРУСУ СКАЗУ CVS ТА L. PASTEUR ПІСЛЯ ДОВГОСТРОКОВОГО ЗБЕРІГАННЯ

Метою експериментів, результати яких представлені у цьому розділі, було порівняльне дослідження впливу складу захисних середовищ і температурних режимів зберігання (позитивних та низьких температур) і термінів зберігання на збереженість промислових штамів ВС після довгострокового зберігання.

Результати досліджень, які представлені у розділі 4, впроваджені у формування та експлуатацію головного і робочого банків промислових штамів ВС в умовах виробництва антирабічних препаратів АТ «БІОЛІК».

4.1. Вплив температурних режимів, складу захисних середовищ і термінів зберігання на збереженість стандартного штаму вірусу сказу CVS

4.1.1. Інфекційна активність стандартного штаму вірусу сказу CVS після зберігання протягом тижня за різних температур

Вихідним контролем вважали інфекційну активність вірусу в РС до маніпуляцій (далі – вихідна інфекційна активність вірусу), яка становила $(4,68 \pm 0,19) \lg \text{CCID}_{50}$.

Після охолодження до -20 , -80 , -196°C та зберігання за цих температур і при 5 та 37°C протягом тижня інфекційна активність вірусу не змінювалася у зразках із сахарозою (-80°C), гліцерином (-80 і -196°C) і сумішшю цих речовин (-196°C) (рис. 4.1.1.1). У інших зразках даний показник вірусу знизився. Найвищу інфекційну активність вірусу було виявлено в зразках після зберігання при -80 і -196°C , найнижчу – при 37°C .

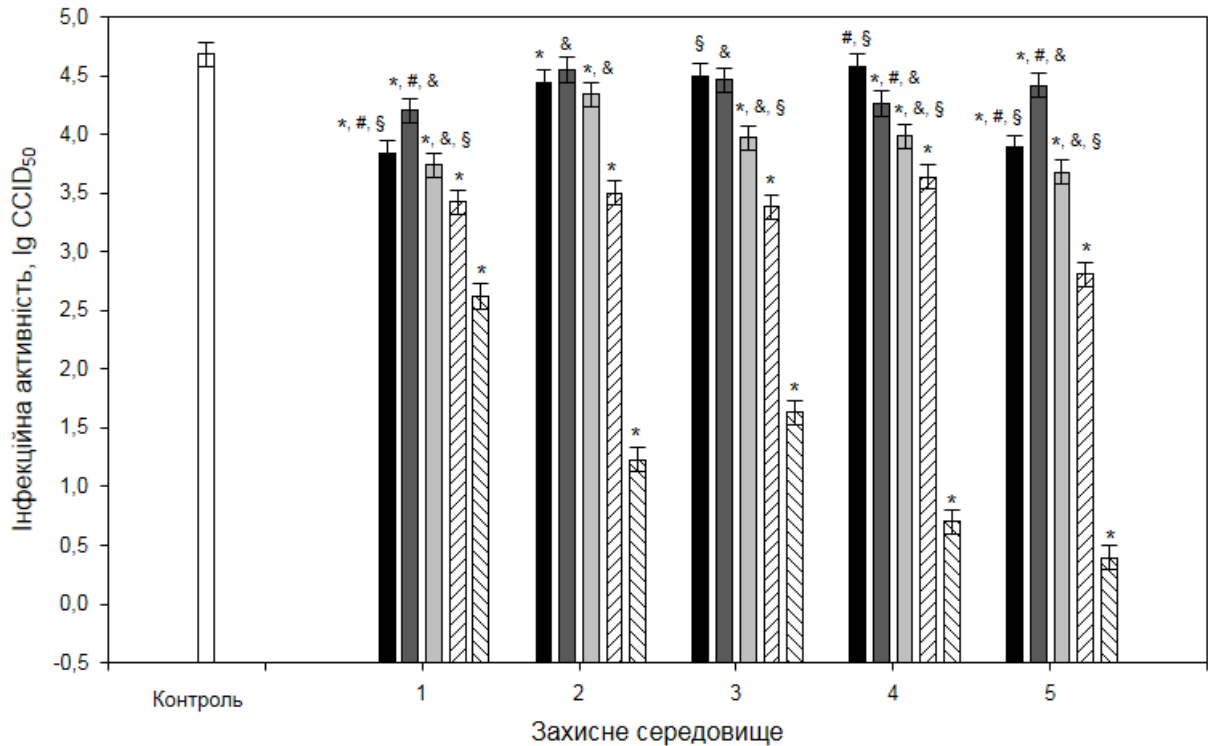


Рис. 4.1.1.1. Інфекційна активність стандартного штаму вірусу сказу CVS після тижня зберігання в захисних середовищах за різних температур: контроль (□); -196°C (■); -80°C (■); -20°C (□); 5°C (▨); 37°C (▩).

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі між температурами -196 та -80°C ; & – відмінності статистично значущі між температурами -80 та -20°C ; § – відмінності статистично значущі між температурами -196 та -20°C ($p < 0,05$; $n = 5$). Склад захисних середовищ (1–5) представлено у розділі 2 «Матеріали й методи дослідження».

4.1.2. Динаміка інфекційної активності стандартного штаму вірусу сказу CVS під час зберігання за різних температур протягом 24-х місяців

Протягом 3-х місяців зберігання при 37°C у всіх зразках відбулася повна інактивація вірусу. В умовах зберігання при 5°C протягом 3-х місяців найвищий показник збереженості вірусу відзначено у РС без домішок – 22% від вихідної інфекційної активності, через 6 місяців вірус інактивувався у всіх зразках, крім середовища з сумішшю сахарози та гліцерину, в якому збереглося 13% від вихідного контролю.

Зміну інфекційної активності стандартного штаму CVS у кожному з захисних середовищ протягом 24-х місяців (термін спостереження) оцінювали за температур -20°C , -80°C та -196°C . У РС без домішок (середовище 1) після зберігання при -20°C протягом 3-х місяців інфекційна активність вірусу знизилася до 73% від вихідного контролю, між 3-м і 6-м місяцями – не змінювалася, між 6-м і 18-м місяцями – знизилася ще і в подальшому залишалася стабільною до 24-х місяців, склавши 53% від вихідного значення (рис. 4.1.2.1). Після зберігання за температури -80°C інфекційна активність вірусу знизилася через 3 місяці на 19% і залишалася стабільною протягом подальшого зберігання. Через 24 місяці інфекційна активність вірусу становила 76% від початкової. В процесі зберігання при -196°C часткова загибель вірусних часток і зниження інфекційної активності вірусу на 18% відбулося тільки на етапі заморожування (рис. 4.1.1.1). Під час подальшого зберігання штаму вірусу за даних умов протягом 24-х місяців його інфекційна активність не змінювалася.

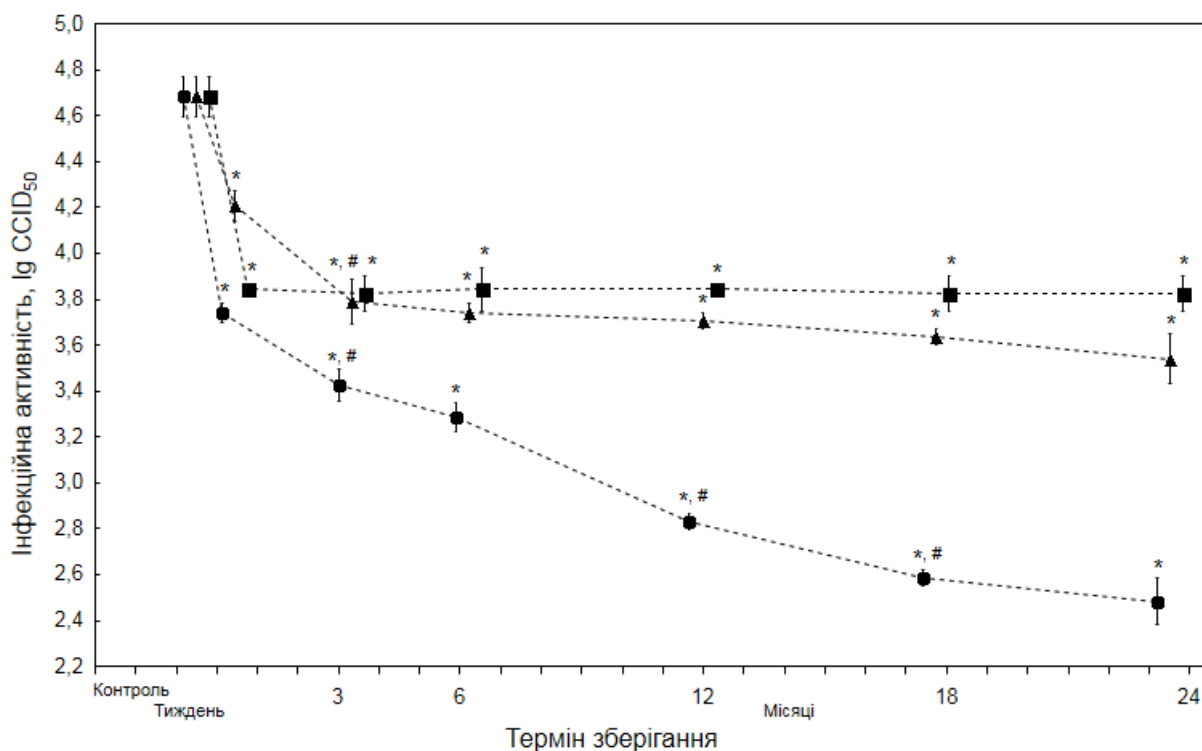


Рис. 4.1.2.1. Інфекційна активність стандартного штаму вірусу сказу CVS в ході зберігання у РС без домішок за різних температур: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■).

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання ($p < 0,05$; $n=5$).

У захисному середовищі із додаванням 5% сахарози (середовище 2) за температури -20°C інфекційна активність вірусу протягом перших 3-х місяців зберігання знизилася до 82%, залишалася на цьому рівні з 3-го по 6-й місяць та знизилася з 6-го по 24-й місяць зберігання до 37% (рис. 4.1.2.2). Динаміка активності вірусу у цьому середовищі за температур зберігання -80 и -196°C була такою ж, як і в середовищі 1. Через 24 місяці зберігання за температури -80°C інфекційна активність вірусу складала 83%, за температури -196°C – 94%.

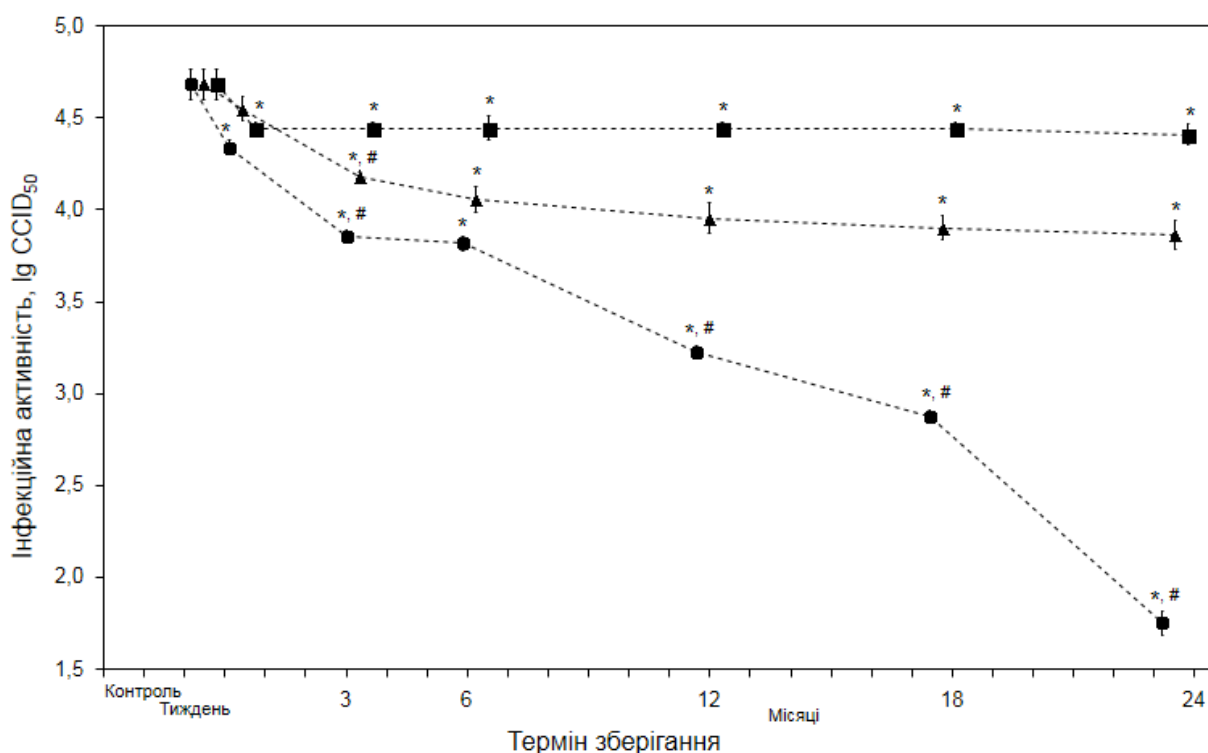


Рис 4.1.2.2. Інфекційна активність стандартного штаму вірусу сказу CVS у ході зберігання у PC з 5% сахарози за різних температур: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■).

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання ($p < 0,05$; $n=5$).

Після зберігання вірусу у PC із додаванням 5% гліцерину (середовище 3) за температури -20°C його інфекційна активність знизилась через 6 місяців до 74%,

через 12 місяців – до 67%, після чого залишалася на одному рівні до кінця терміну спостереження та через 24 місяці складала 62% від вихідного контролю (рис. 4.1.2.3). За температури -80°C активність вірусу знизилася протягом перших 6 місяців і залишалася стабільною до 24-х місяців, склавши 80% від вихідної. Температура -196°C забезпечувала стабільність даного показника протягом всього терміну спостереження на рівні 94%.

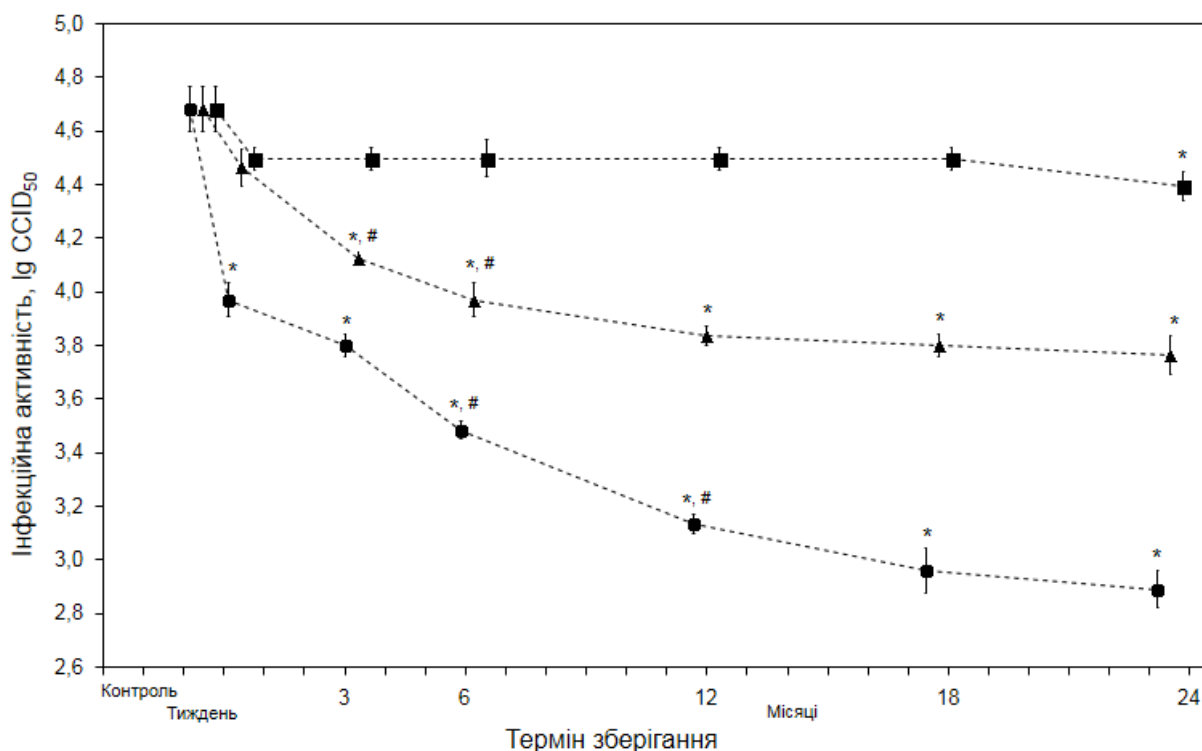


Рис. 4.1.2.3. Інфекційна активність стандартного штаму вірусу сказу CVS у ході зберігання у РС з 5% гліцерину за різних температур: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■).

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання ($p < 0,05$; $n = 5$).

Встановлено, що в РС із додаванням 5% сахарози і 5% гліцерину (середовище 4) за температури -20°C інфекційна активність вірусу знижувалася протягом перших 3-х місяців зберігання і між 6-м і 24-м місяцями (рис. 4.1.2.4). Через 3 місяці при -20°C збереглося 80% інфекційної активності вірусу, через 24 місяці – 63%. При -80°C часткова загибель вірусних часток в середовищі 4 відбувалася тільки на етапі заморожування. Протягом подальшого зберігання

досліджуваний показник залишався стабільним до кінця терміну спостереження і через 24 місяці становив 80%. Температура зберігання -196°C забезпечувала збереження вихідної інфекційної активності вірусу протягом 18-ти місяців, між 18-м і 24-м місяцями вона знизилася до 94%.

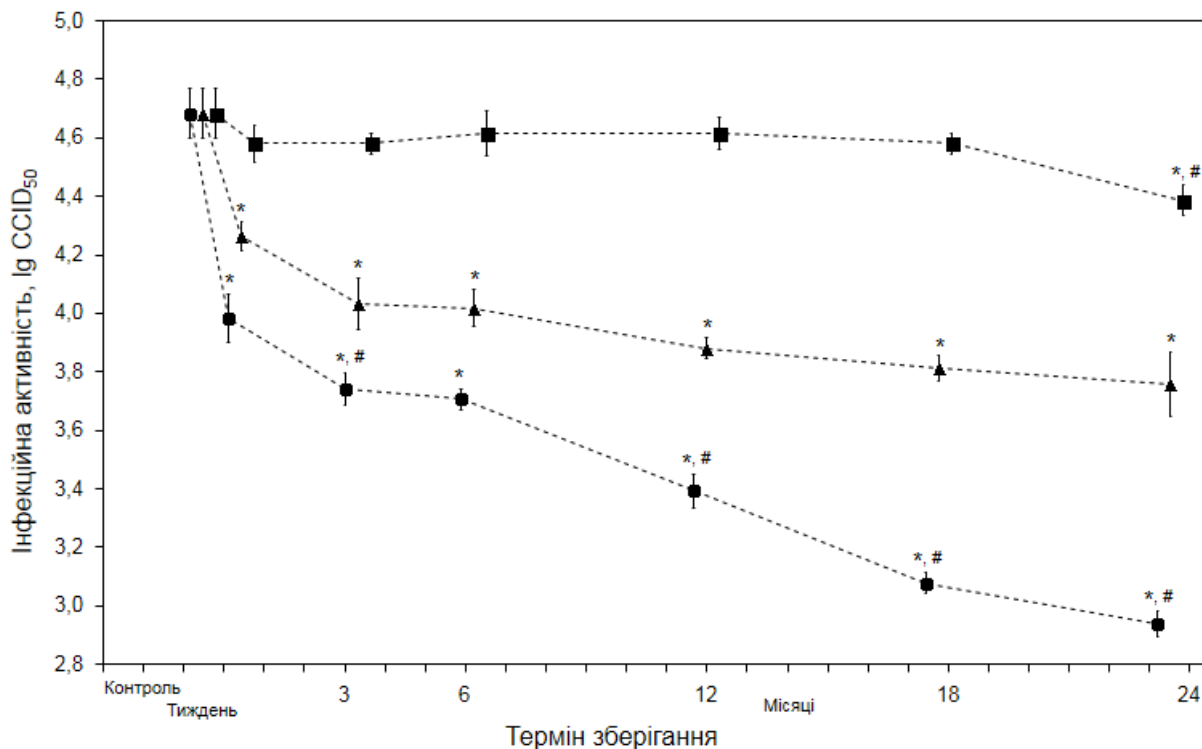


Рис. 4.1.2.4. Інфекційна активність стандартного штаму вірусу сказу CVS у ході зберігання у РС з 5% сахарози та 5% гліцерину за різних температур: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■).

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання ($p < 0,05$; $n = 5$).

У захисному середовищі із додаванням 5% мальтози (середовище 5) за температури -20°C інфекційна активність вірусу поступово знижувалася протягом 24-х місяців зберігання, після чого складала 8% від вихідної активності (рис. 4.1.2.5). При -80°C інфекційна активність понижалася в перші 3 місяці зберігання і потім залишалася стабільною до кінця терміну спостереження, склавши 73% від вихідного контролю. У процесі зберігання при -196°C у середовищі з мальтозою 17% вірусних часток загинули на етапі заморожування (рис. 4.1.1.1). Протягом перших 12 місяців зберігання інфекційна активність

вірусу не змінювалася, але на відміну від усіх вищеописаних зразків, вона знизилася між 12-м і 24-м місяцями зберігання і складала 73% від контролю.

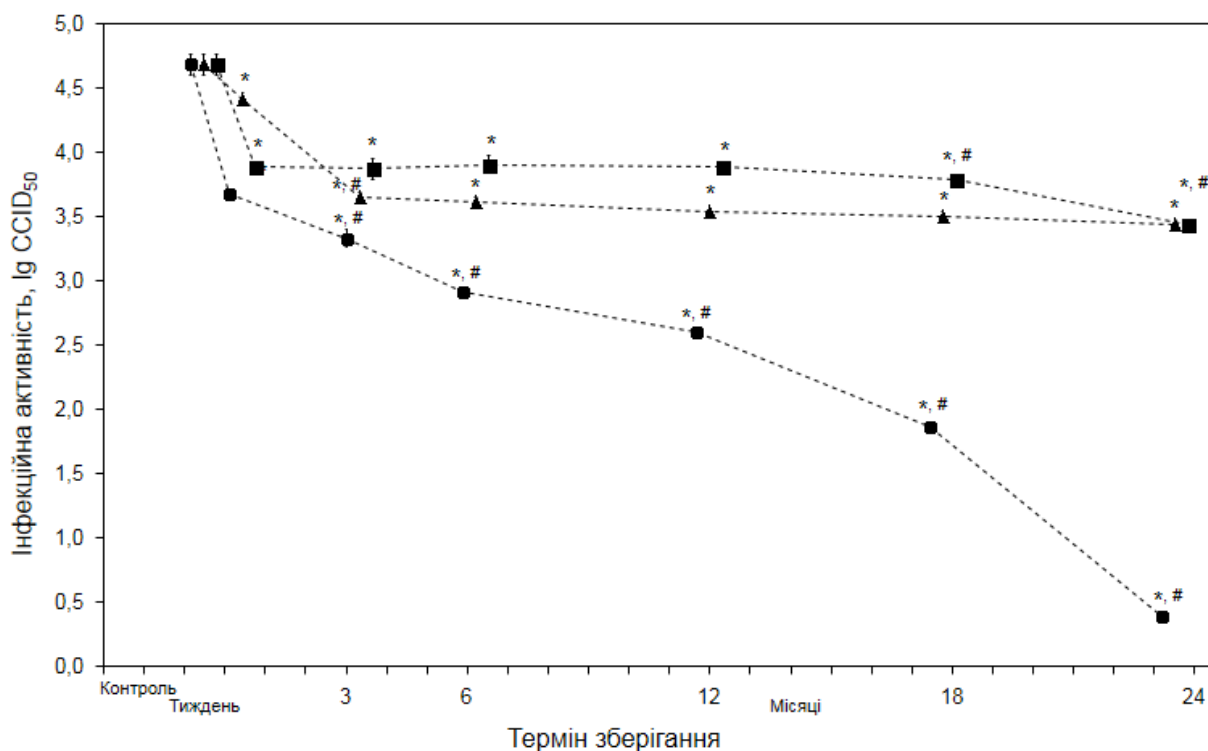


Рис. 4.1.2.5. Інфекційна активність стандартного штаму вірусу сказу CVS у ході зберігання у РС з 5% мальтози за різних температур: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■).

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання ($p < 0,05$; $n = 5$).

4.1.3. Інфекційна активність стандартного штаму вірусу сказу CVS після зберігання за низьких температур у різних захисних середовищах протягом 24-х місяців

Встановлено, що на інфекційну активність стандартного штаму вірусу сказу CVS протягом 24-х місяців (термін спостереження) зберігання значуще впливали: склад захисного середовища, температура і термін зберігання. Найбільше на даний показник впливала температура зберігання, а меншою мірою – термін зберігання і склад захисного середовища.

В ході вивчення впливу захисних речовин, доданих в РС, на збереженість вірусу були отримані наступні результати. Через 24 місяці зберігання інфекційна активність вірусу була вищою в порівнянні з середовищем без домішок (середовище 1) за температури -20°C – у середовищі з гліцерином (на 9%) та сумішшю сахарози і гліцерину (на 10%), при -80°C – з сахарозою (на 6%), при -196°C – з сахарозою (на 12%), гліцерином (на 12%) і їх сумішшю (на 12%) (рис. 4.1.3.1). В інших середовищах показник збереження не відрізнявся або був нижче, ніж в середовищі 1. В усіх досліджених захисних середовищах активність вірусу, що зберігався при -20°C , була нижчою за таку за інших температур.

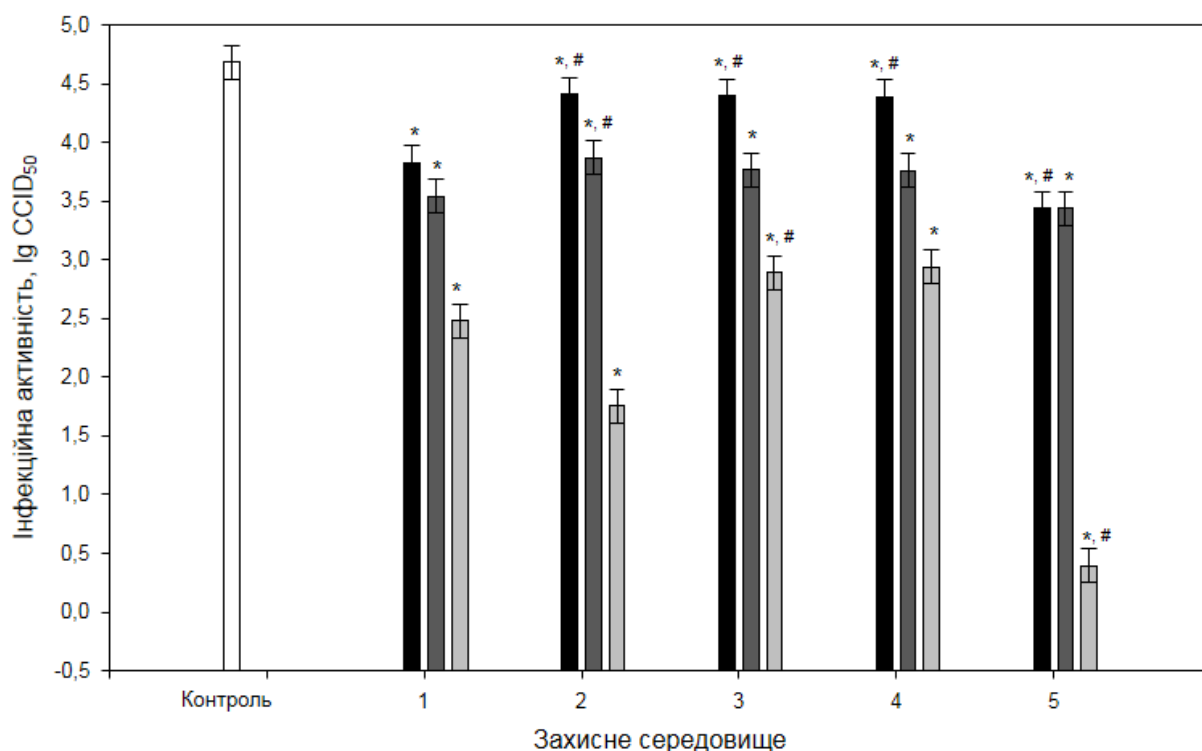


Рис. 4.1.3.1. Інфекційна активність стандартного штаму вірусу сказу CVS через 24 місяці зберігання в захисних середовищах за різних температур: контроль (\square); -196°C (\blacksquare); -80°C (\blacksquare); -20°C (\square).

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з середовищем 1 за кожної з температур ($p < 0,05$; $n = 5$).

При -196°C інфекційна активність вірусу була вище, ніж при -80°C , у середовищах із додаванням сахарози, гліцерину та їх суміші. В інших середовищах значущої різниці між показниками інфекційної активності за цих

температур не спостерігали. Найвищі результати збереженості стандартного штаму вірусу сказу CVS через 24 місяці зберігання спостерігали при -80°C у РС із додаванням сахарози (83% від вихідної інфекційної активності), гліцерину (80%) та їх суміші (80%), а при -196°C – у РС без домішок (82%), РС із додаванням сахарози (94%), гліцерину (94%) та їх суміші (94%).

Отримані результати свідчать про те, що позитивні температури не придатні для тривалого зберігання стандартного штаму вірусу сказу CVS. За виробничої необхідності для зберігання вірусу протягом 6-ти місяців можна використовувати температурний режим -20°C і захисне середовище на основі РС із додаванням сахарози. Такі умови зберігання через 6 місяців забезпечують збереженість 82% вихідної інфекційної активності вірусу. Для довгострокового зберігання стандартного штаму вірусу сказу CVS (до 24-х місяців) доцільно використовувати захисні середовища з сахарозою, гліцерином та їх сумішшю і температурні режими -80 та -196°C , які забезпечували збереженість 80–83 (-80°C) та 94% (-196°C) вихідної інфекційної активності вірусу відповідно.

4.2. Вплив температурних режимів, складу захисних середовищ і термінів зберігання на збереженість штаму L. Pasteur

4.2.1. Інфекційна активність штаму вірусу сказу L. Pasteur в ході зберігання в різних захисних середовищах за температури 37°C

В якості контролю використовували інфекційну активність вірусу в РС до маніпуляцій (далі – вихідна інфекційна активність вірусу), яка становила $(5,45 \pm 0,19) \lg \text{CCID}_{50}$. З огляду на регламентні вимоги до виробництва антирабічних препаратів, умови зберігання вірусу вважали ефективними при збереженості не менше 80% від вихідної інфекційної активності вірусу.

Через 5 діб зберігання при 37°C статистично значуще зниження інфекційної активності вірусу сказу штаму L. Pasteur в порівнянні з контролем відбулося в усіх досліджених захисних середовищах (рис. 4.2.1.1). При цьому в зразках з РС без домішок збереглося 62% від початкового значення активності вірусу, в зразках з 5% гліцерину, 5% сахарози, сумішшю 5% сахарози і 5% гліцерину, 5%

мальтози – 52, 40, 34 і 19% відповідно. Через 10 і 15 діб спостерігали подальше зниження інфекційної активності у всіх досліджених захисних середовищах. Повна інактивація вірусу сталася між 20-ю і 30-ю добою зберігання.

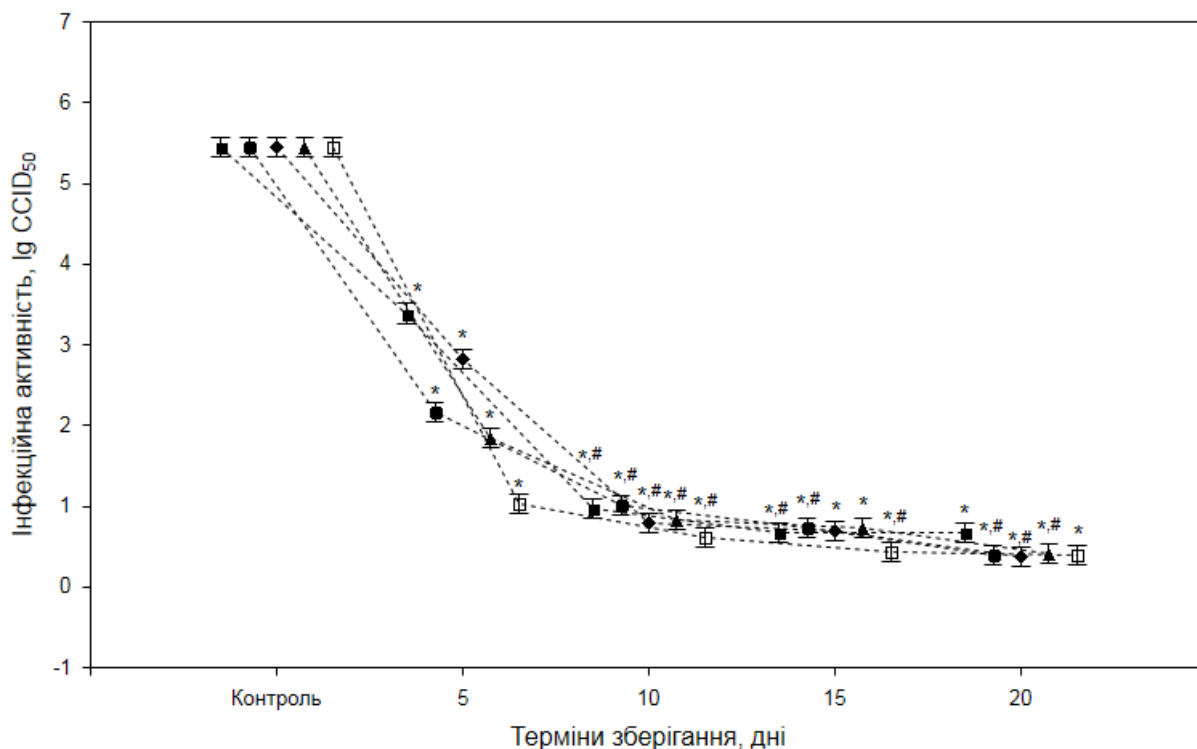


Рис. 4.2.1.1. Інфекційна активність вірусу сказу штаму *L. Pasteur* в ході зберігання за температури 37°C в різних захисних середовищах: ■ – середовище 1; ● – середовище 2; ◆ – середовище 3; ▲ – середовище 4; □ – середовище 5.

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання ($p < 0,05$; $n=5$).

4.2.2. Інфекційна активність вірусу сказу штаму *L. Pasteur* в ході зберігання в різних захисних середовищах за температури 5°C

В ході зберігання при 5°C протягом 5-ти діб статистично значуще зниження інфекційної активності вірусу сказу штаму *L. Pasteur* в порівнянні з контролем відбулося в усіх досліджених захисних середовищах (рис. 4.2.2.1). Найвищі показники активності на цьому терміні зберігання були в зразках з 5% гліцерину (91% від вихідної інфекційної активності вірусу), без домішок (87%) і з 5% сахарози (82%). В інших середовищах збереглося менше 80% від початкового

значення активності. Протягом 15-ти діб збереженість вірусу, яка задовольняла регламентні вимоги, забезпечувало тільки середовище з 5% гліцерину. Інфекційна активність вірусу у цьому середовищі через 10 і 15 діб складала 86 і 81% від значення контролю відповідно. Подальше зберігання призвело до зниження активності вірусу в усіх досліджених захисних середовищах. Через 6 місяців (180 діб) зберігання найвищу збереженість вірусу в даних умовах відзначали в РС без домішок – 38% від вихідної інфекційної активності. Між 6-м і 12-м місяцями зберігання відбулася повна інактивація вірусу у всіх зразках.

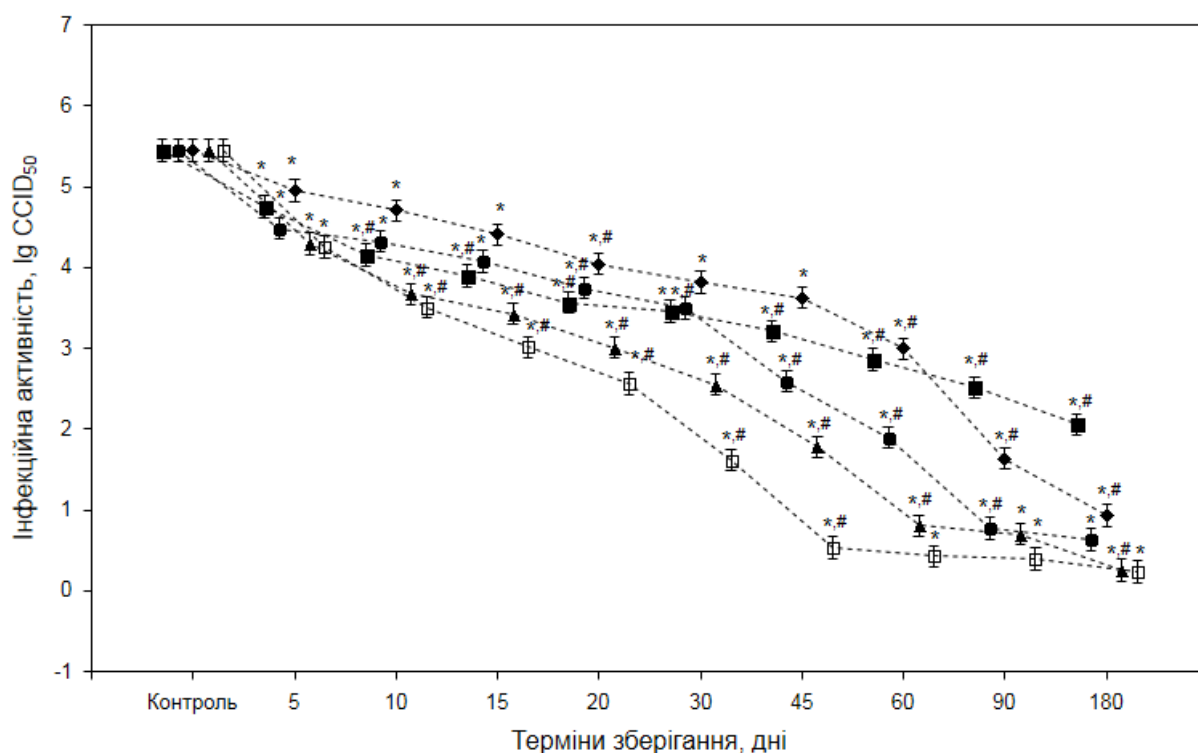


Рис. 4.2.2.1. Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur в ході зберігання за температури 5°C в різних захисних середовищах: ■ – середовище 1; ● – середовище 2; ◆ – середовище 3; ▲ – середовище 4; □ – середовище 5.

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання ($p < 0,05$; $n = 5$).

4.2.3. Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur в ході зберігання в різних захисних середовищах за температур -20 , -80 и -196°C протягом 24-х місяців

Динаміку інфекційної активності вакцинного штаму L. Pasteur за температур -20 , -80 і -196°C оцінювали протягом 24-х місяців (термін спостереження) окремо в кожному із захисних середовищ. Через тиждень після розміщення на зберігання в РС без домішок (середовище 1) активність вірусу була значуще нижче контролю за всіх температур (рис. 4.2.3.1). На даному терміні при -20°C досліджуваний показник знизився до 85% від початкового значення і залишався на цьому рівні до 3-х місяців. Між 3-м і 18-м місяцями зберігання відбулося подальше пониження інфекційної активності вірусу, після чого вона була стабільною до 24-х місяців зберігання і складала 53% від значення контролю. Аналогічну динаміку активності вірусу спостерігали і при -80°C . Через 24 місяці зберігання в даних умовах збереглося 67% від початкового значення інфекційної активності вірусу. Під час зберігання при -196°C , так само, як і за інших температур, спостерігали часткову загибель вірусних часток на етапі заморожування, що призвело до втрати 21% активності вірусу. В ході подальшого зберігання до 24-х місяців при -196°C інфекційна активність вірусу не змінювалася.

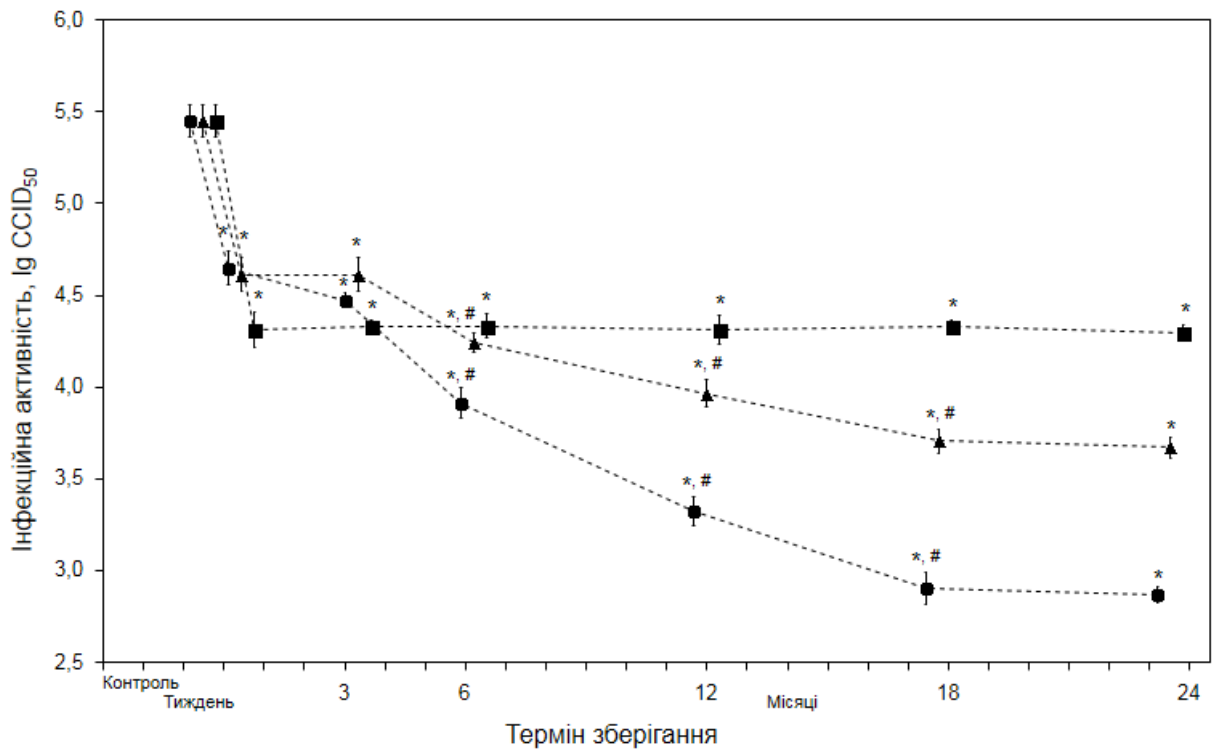


Рис. 4.2.3.1. Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur в ході зберігання у РС без домішок за різних температур: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■).

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання ($p < 0,05$; $n = 5$).

У захисному середовищі із додаванням 5% сахарози (середовище 2) через тиждень зберігання при -20°C інфекційна активність вірусу значуще знизилася до 86% порівняно з контролем, після чого залишалася стабільною протягом 3-х місяців (рис. 4.2.3.2). При подальшому зберіганні вірусу відбувалося зниження показників інфекційної активності, яка через 24 місяці складала 37% від значення контролю. За температури -80°C динаміка активності зразків з сахарозою була аналогічною показникам активності у РС без домішок за даної температури. Через 24 місяці в них збереглося 73% від вихідної інфекційної активності. Протягом тижня зберігання при -196°C активність вірусу не змінювалася. Через 3 місяці вона знизилася на 9% і залишалася стабільною до 18-ти місяців зберігання, після чого знову продовжила знижуватися і через 24 місяці складала 83% від початкового значення.

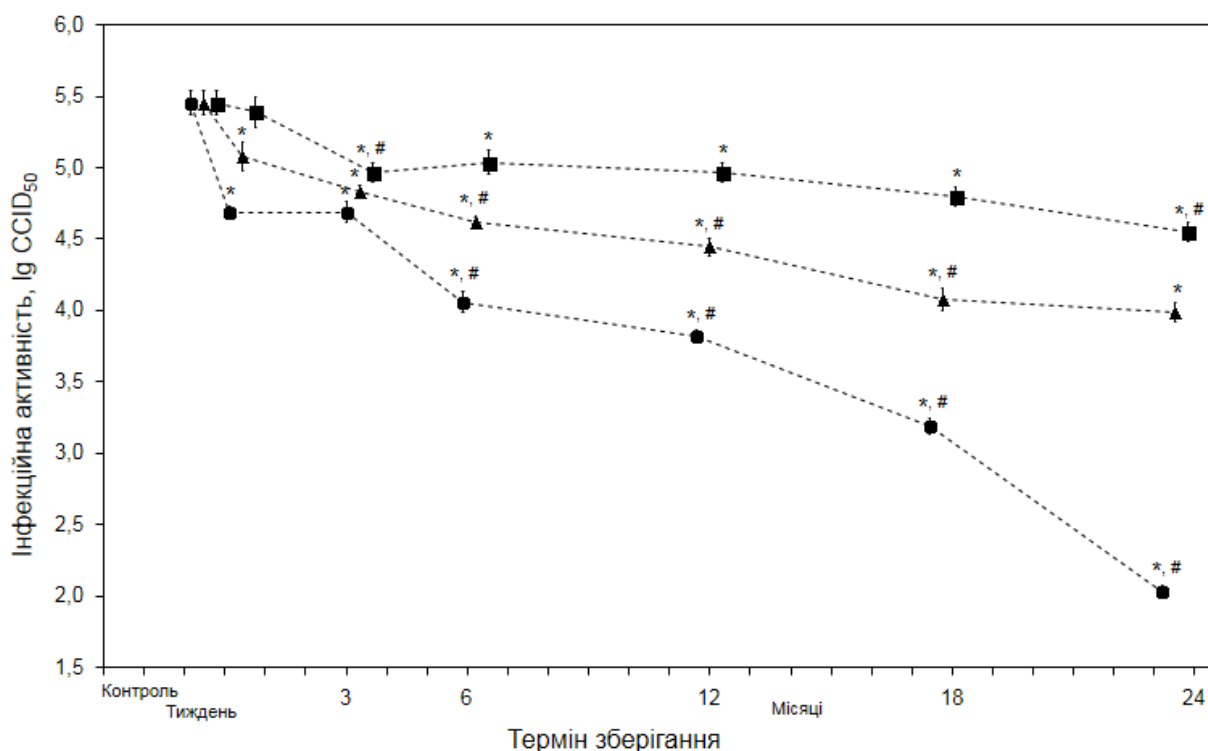


Рис. 4.2.3.2. Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur в ході зберігання у РС з 5% сахарози за різних температур: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■).

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання ($p < 0,05$; $n = 5$).

В ході зберігання протягом тижня вірусу в РС із додаванням 5% гліцерину (середовище 3) його активність була за всіх температур значуще нижче контролю (рис. 4.2.3.3). При -20°C показник збереженості вірусу знижувався між 3-м і 6-м, а також між 12-м і 24-м місяцями зберігання, і після закінчення терміну спостереження складав 55% від початкового значення. В ході зберігання при -80°C інфекційна активність вірусу знижувалася між 6-м і 18-м місяцями і складала через 24 місяці 71% від вихідного показника. Температурний режим -196°C забезпечував стабільність вірусу в проміжку між 1-м тижнем і 18-м місяцем зберігання. Через 24 місяці за даної температури збереглося 83% від вихідної інфекційної активності вірусу.

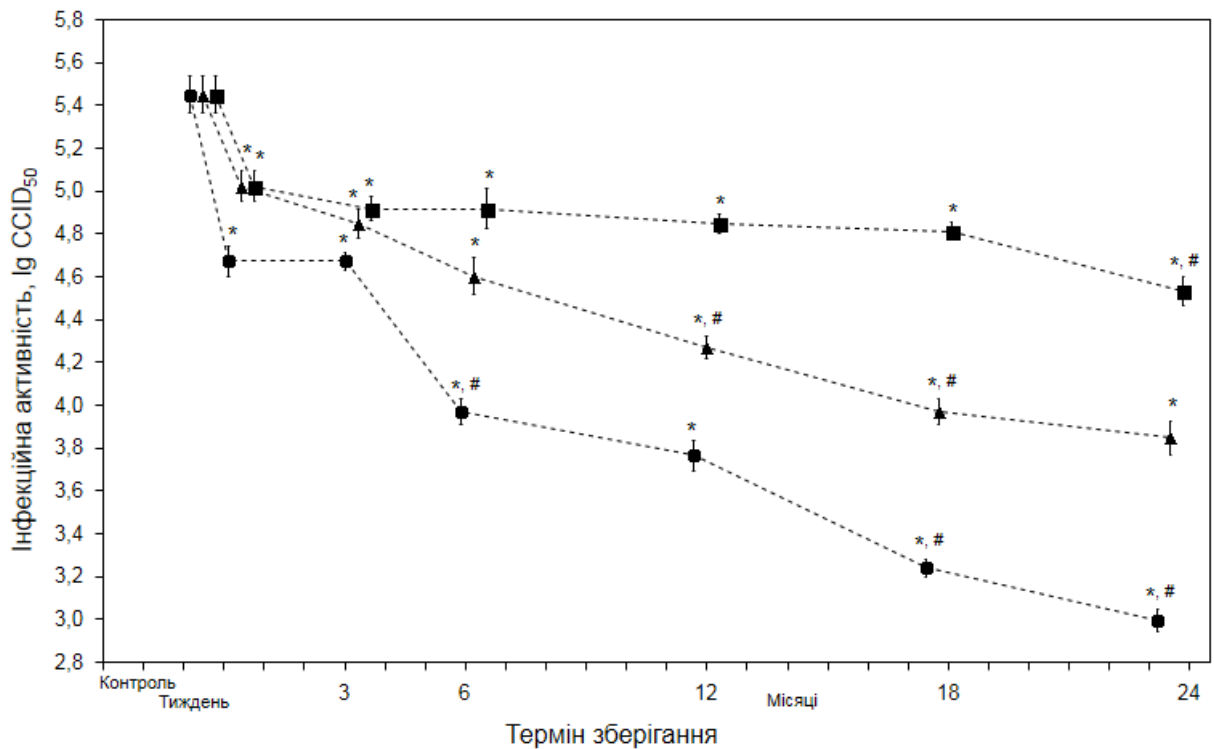


Рис. 4.2.3.3. Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur в ході зберігання у РС з 5% гліцерину за різних температур: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■).

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання ($p < 0,05$; $n = 5$).

У РС із додаванням 5% сахарози і 5% гліцерину (середовище 4) інфекційна активність вірусу при -20°C знижувалася протягом тижня і після 3-х місяців зберігання до кінця терміну спостереження (рис. 4.2.3.4). Через 24 місяці збереглося 56% від її вихідного значення. При -80°C через тиждень зберігання в даному середовищі активність вірусу знизилася на 13% порівняно з контролем і залишалася стабільною до 3-х місяців. Між 3-м і 12-м місяцями зберігання спостерігали зниження показника збереженості вірусу, після чого він залишався на попередньому рівні до 24-х місяців зберігання і складав 74% від інфекційної активності контролю. Температура -196°C забезпечувала стабільність вірусу в процесі його заморожування і зберігання протягом тижня. Через 3 місяці активність вірусу в даних умовах знизилася на 10% і залишалася на одному рівні до 18-ти місяців, потім почала знижуватися і через 24 місяці складала 87% від вихідної інфекційної активності вірусу.

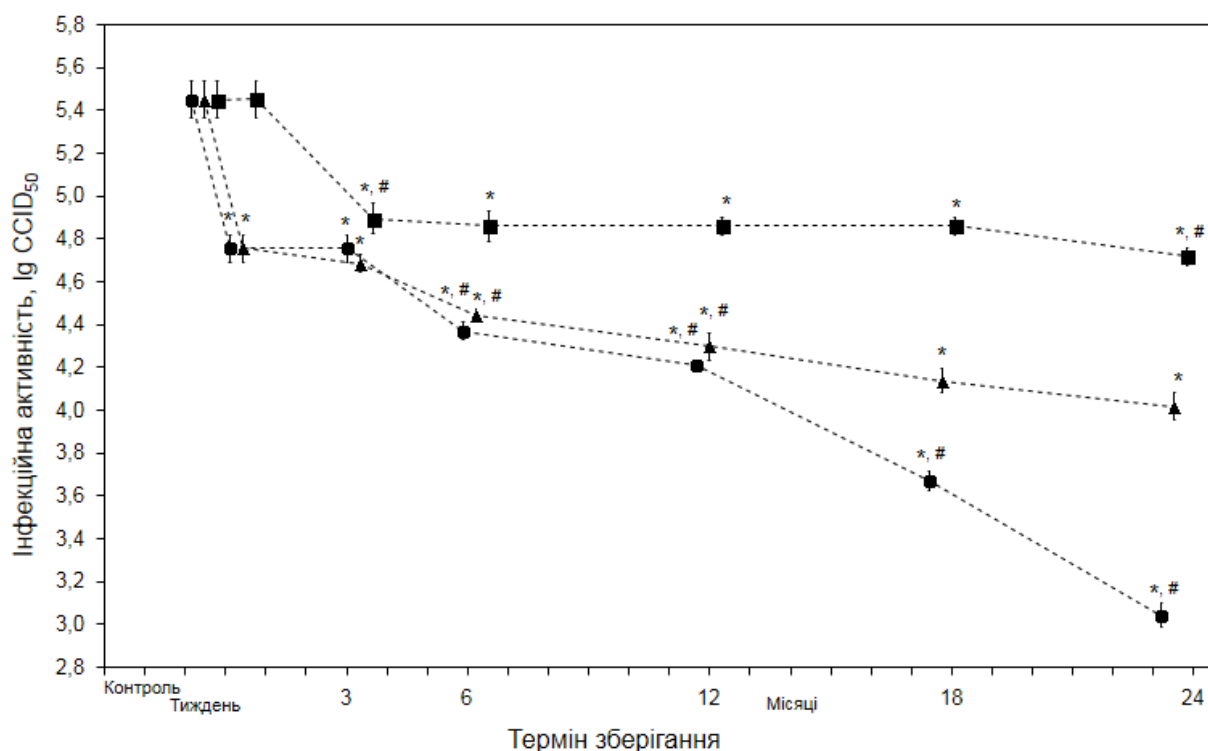


Рис. 4.2.3.4. Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur в ході зберігання у РС з 5% сахарози та 5% гліцерину за різних температур: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■).

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання ($p < 0,05$; $n = 5$).

У захисному середовищі із додаванням 5% мальтози (середовище 5) за температури -20°C зниження інфекційної активності вірусу відбувалося протягом усіх 24-х місяців зберігання (рис. 4.2.3.5). Після закінчення терміну спостереження в даних умовах збереглося 7% від вихідної активності вірусу. При -80°C активність вірусу знижувалася протягом перших 3-х місяців, між 6-м і 12-м місяцями, а також 18-м і 24-м місяцями зберігання, склавши 61% від активності контролю. У середовищі з мальтозою температура -196°C забезпечувала збереженість вірусних часток на етапах заморожування і зберігання протягом тижня. В ході подальшого зберігання протягом 3-х місяців активність вірусу знизилася, а потім не змінювалась до 24-х місяців, склавши 77% від вихідного показника.

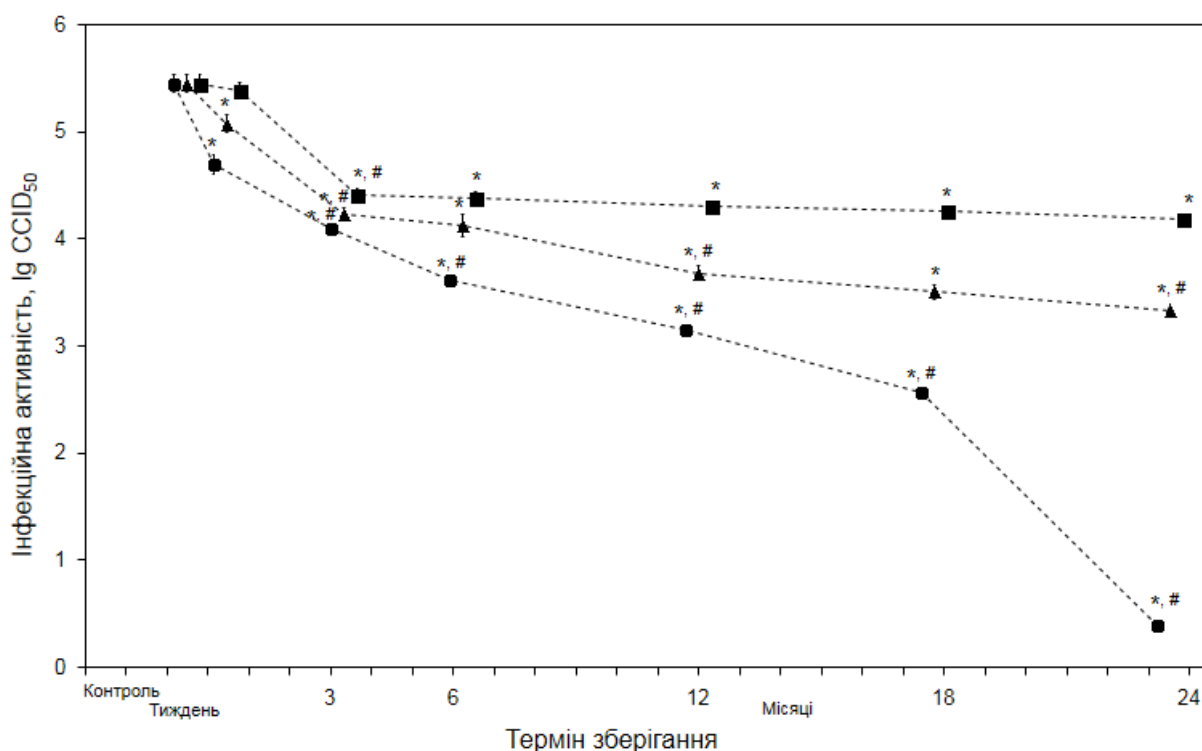


Рис. 4.2.3.5. Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur в ході зберігання у РС з 5% мальтози за різних температур: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■).

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання ($p < 0,05$; $n = 5$).

В ході вивчення впливу захисних речовин, доданих в РС, на збереженість вірусу безпосередньо після зберігання протягом 24-х місяців були отримані наступні результати (рис. 4.2.3.6). Через 24 місяці зберігання інфекційна активність вірусу була вище в порівнянні з середовищем без домішок (середовище 1) за температури -20°C у середовищі з сумішшю сахарози і гліцерину (на 3%); при -80°C – з сахарозою (на 6%) і сумішшю сахарози гліцерину (на 7%); при -196°C – з сахарозою (на 4%), гліцирином (на 4%) та їх сумішшю (на 8%). В інших середовищах показник збереження не відрізнявся або був нижче, ніж в середовищі 1. В усіх досліджених захисних середовищах активність вірусу, що зберігався при -196°C , була вище, ніж за інших температур; при -80°C – вище, ніж при -20°C . Найвищі результати збереженості вірусу сказу штаму L. Pasteur через 24 місяці зберігання спостерігали при -196°C у РС із додаванням сахарози (83%), гліцерину (83%) та їх суміші (87%).

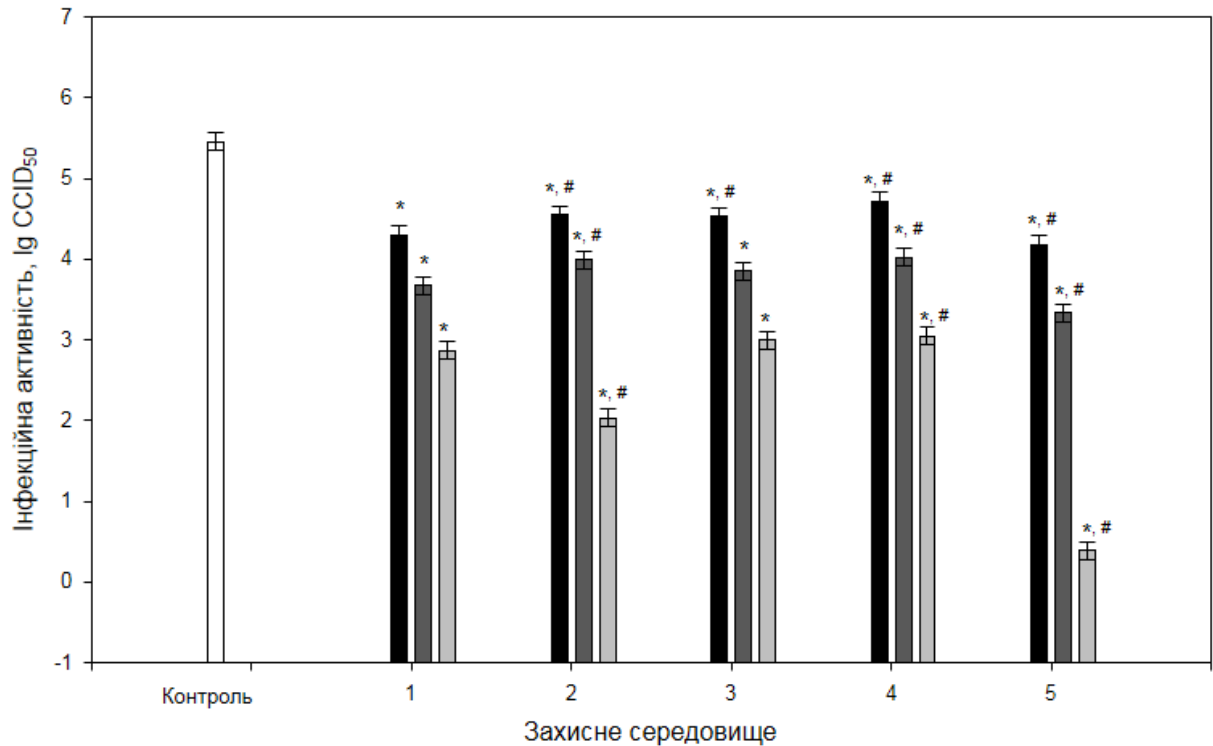


Рис. 4.2.3.6. Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur через 24 місяці зберігання в захисних середовищах за різних температур: контроль (□); -196°C (■); -80°C (▣); -20°C (□).

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з середовищем 1 за кожної з температур ($p < 0,05$; $n = 5$).

Отримані результати вказують на непридатність температури 37°C для зберігання вірусу сказу штаму L. Pasteur. При 5°C термін його зберігання обмежений 15-ю добами в РС із додаванням 5% гліцерину. За виробничої необхідності можливе зберігання вірусу при -20°C в захисному середовищі на основі РС із додаванням суміші 5% сахарози і 5% гліцерину (до 6-ти місяців). Температурний режим -80°C і середовище із додаванням 5% сахарози забезпечують високу збереженість вірусу до 12-ти місяців зберігання – 82% від початкового показника. Встановлено, що температурний режим зберігання -196°C і захисні середовища на основі РС також забезпечують високі показники збереженості інфекційної активності вірусу сказу штаму L. Pasteur протягом 24-х місяців (термін спостереження). Найвищу збереженість вірусу в даних умовах забезпечували консервуючі середовища на основі РС (DMEM з 0,5% альбуміну

людини) із додаванням 5% сахарози – 83% від вихідного контролю, 5% гліцерину – 83% і їх суміші – 87%.

Отримані у дослідженні результати, які представлено у розділі 4, свідчать про різні механізми дії пошкоджувальних факторів за температур 37, 5, –20, –80, –196°C на ВС та про різну чутливість штамів CVS та L. Pasteur до дії пошкоджувальних факторів за деяких температурних режимів зберігання. За температури 37°C штаму CVS загинув в усіх середовищах консервування протягом 3-х місяців зберігання, штаму L. Pasteur – протягом 30-ти діб. Найбільш імовірною причиною інактивації вірусу за температури 37°C була агрегація віріонів. За температури 5°C штаму CVS інактивувався майже в усіх зразках протягом 6-ти місяців, штаму L. Pasteur – між 6-м і 12-м місяцями зберігання. Як відомо, температури 2–8°C впливають на динамічну структуру різних білків, особливо ферментів. Цей фактор та зміна адгезивних і електростатичних властивостей поверхні віріонів, що призводять до їхньої агрегації, скоріше за все, і викликали інактивацію ВС за температури 5°C.

За низьких температур ВС підлягав пошкоджувальній дії низьки фізико-хімічних факторів, які супроводжують процеси кристалізації води на етапах заморожування-відтавання і перебування за різних температур протягом 24-х місяців.

Детальний аналіз можливих механізмів кріопшкоджень та захисної дії кріопротекторних домішок до РС під час довгострокового зберігання за різних температур представлено у розділі «Узагальнення і обговорення результатів». Чинниками, від яких залежала збереженість обох штамів ВС за низьких температур із збільшенням терміну зберігання залишилися температурні режими зберігання та склад захисних середовищ.

Враховуючи те, що діапазон температур від –10 до –80°C відповідає зоні кристалізації охолодженої та переохолодженої води [228], і, з огляду на багатокомпонентність середовищ консервування та значення евтектичних температур для розчинів різних електролітів і кріопротекторів [138], можна припустити: віріони в процесі зберігання при –20°C постійно перебувають у

рідкій фазі в мікроканалах між кристалами льоду і піддаються впливу сукупності факторів (гіперконцентрація солей та інших компонентів; зміна рН середовища; дегідратація макромолекул; порушення міжмолекулярних взаємодій («ефекти розчинів»)) [229, 230]. Крім того, під дією низьких температур могли відбуватися розпушення і агрегація білків нуклеокапсиду [138] та пошкодження вірусної РНК-залежної РНК-полімерази. З подовженням термінів зберігання при -20°C відбувалося подальше збільшення кристалів льоду з підвищенням концентрації солей та інших компонентів, що посилювало «ефекти розчинів».

Зниження показника інфекційної активності вірусу в процесі зберігання при -80°C підтверджує пролонгацію завершення вторинної кристалізації в мікроканальцях протягом декількох місяців після досягнення цієї температури у зазначених багатокомпонентних захисних середовищах. З цим ефектом пов'язане додаткове пошкодження вірусних часток під впливом концентрованих розчинених речовин.

Більш високі показники збереженості вірусу в середовищах, що містять кріопротектори, в порівнянні з середовищем без домішок, свідчать про те, що дані речовини знизили точку евтектики зразків, що зберігалися. Показаний захисний ефект від внесення в РС проникаючого (гліцерин) і непроникаючого (сахароза) кріопротекторів свідчить про прояв їх гідратаційних властивостей при заморожуванні і низькотемпературному зберіганні зразків. Більш високий показник інфекційної активності вірусу в середовищах із сахарозою порівняно з таким у середовищі з мальтозою, скоріш за все, пов'язаний з тим, що сахароза має більш високу здатність до зв'язування води [138]. Крім цього, вивчені захисні середовища на основі DMEM із ФС ВРХ або СА людини, очевидно, стабілізують капсид і суперкапсид віріонів, про що свідчать результати збереженості вірусу в РС без кріопротекторів.

За матеріалами розділу 4 опубліковані роботи [231–235].

РОЗДІЛ 5

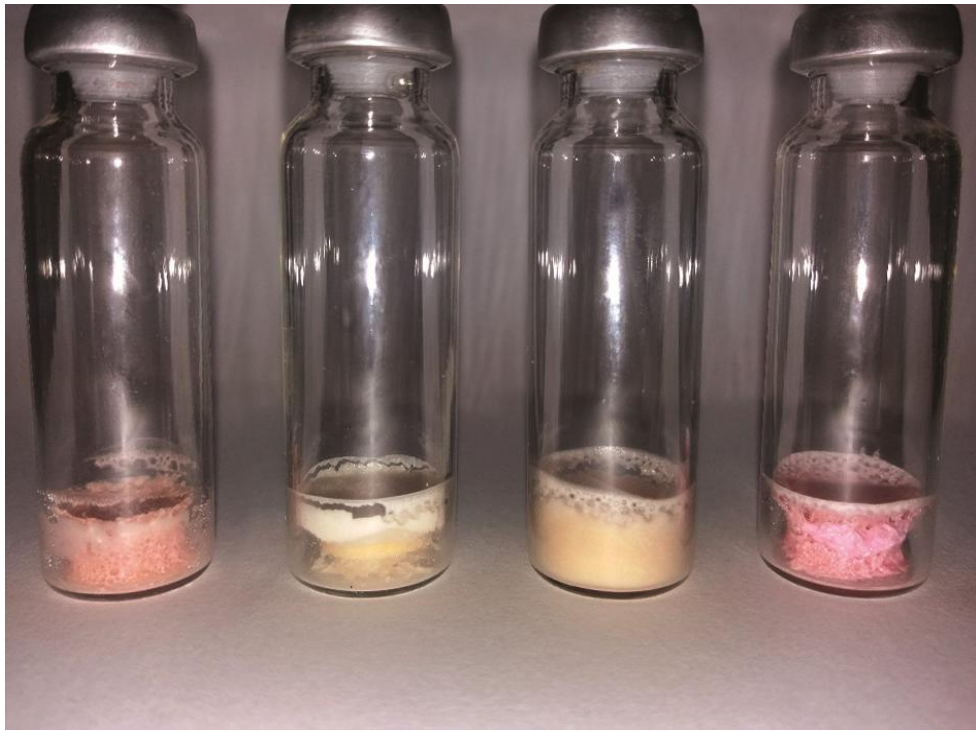
ЛІОФІЛІЗАЦІЯ ШТАМУ L. PASTEUR ТА ЙОГО ПОДАЛЬШЕ ЗБЕРІГАННЯ ЗА РІЗНИХ ТЕМПЕРАТУР

Метою експериментів з ліофілізації штаму L. Pasteur було дослідження впливу складу захисних середовищ і температурних режимів зберігання після ліофілізації на збереженість ліофілізованого ВС та технологічні показники ліофілізованих зразків.

Представлені у цьому розділі досліджень результати впроваджені у формування та експлуатацію головного банку промислових штамів ВС в АТ «БІОЛІК» для забезпечення виробництва антирабічної вакцини для ветеринарної медицини.

5.1. Оцінка зовнішнього вигляду ліофілізату вірусу

Після закінчення циклу ліофілізації вірусу відповідно до технологічного регламенту візуально оцінювали зовнішній вигляд ліофілізованих зразків за внутрішньою нормативною документацією підприємства [123]. Результати спостережень свідчили про те, що структура, форма краю та вид поверхні ліофілізату залежать від кількості желатину та сахарози у захисних середовищах. Після ліофілізації в середовищах 1, 2 та 4 зразки мали пористу структуру, нерівні краї та матову поверхню (рис. 5.1.1). У зразках, ліофілізованих у середовищі 3, була однородна структура, рівні краї та блискуча поверхня. Зберігання зразків протягом 6-ти, 12-ти, 18-ти та 24-х місяців за усіх температурних режимів не впливало на зовнішній вигляд ліофілізатів.



A

B

C

D

Рис. 5.1.1. Зовнішній вигляд зразків вірусу сказу штаму L. Pasteur після ліофілізації у різних захисних середовищах: А – 1; В – 2; С – 3; D – 4.

5.2. Визначення часу відновлення ліофілізату вірусу

Відповідно до технологічного регламенту оцінювали час відновлення ліофілізату вірусу за внутрішньою нормативною документацією підприємства [123]. В ході статистичного аналізу результатів було встановлено, що на час відновлення ліофілізованих препаратів вірусу значуще впливали склад захисних середовищ і температура зберігання, при цьому більший вклад вносив склад захисних середовищ. Термін зберігання препаратів за усіх температур значуще не впливав на час відновлення ліофілізату вірусу. На рис. 5.2.1 представлені дані після 24-х місячного зберігання зразків за різних температур. Час відновлення препаратів після зберігання при 5°C був статистично значуще меншим, ніж після зберігання при -80°C в середовищах 1, 2 та 3, а при -20°C – в середовищах 1 та 2. Було встановлено, що додавання 3% желатину (середовище 2) в захисне середовище значно збільшує час відновлення препаратів, що ускладнює їх практичне використання. Час відновлення зразків, ліофілізованих в середовищах 3 та 4, був значуще більшим, ніж в середовищі 1, але відповідав промислового

регламенту (не більше 1 хв.). Статистично значущі відмінності в часі відновлення зразків з середовищами 3 та 4 були встановлені тільки за температури -80°C .

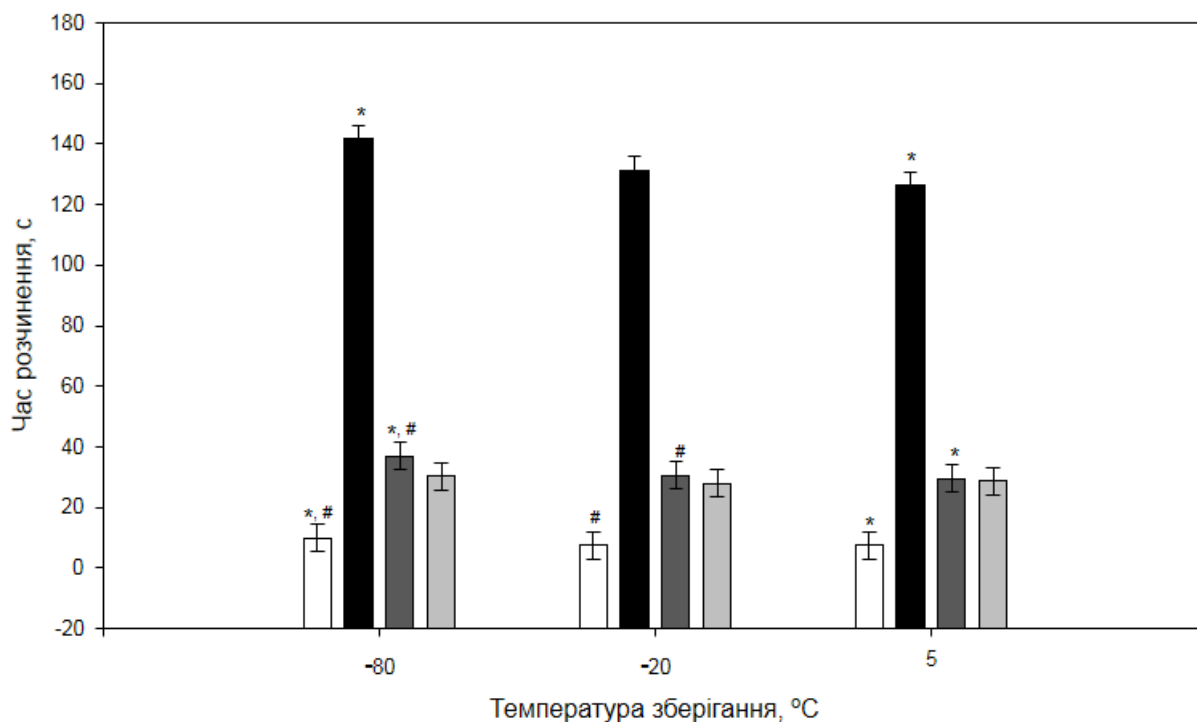


Рис. 5.2.1. Час відновлення зразків вірусу сказу штаму L. Pasteur, ліофілізованих в різних захисних середовищах, після 24-місячного зберігання за різних температур: □ – середовище 1; ■ – середовище 2; ■ – середовище 3; □ – середовище 4.

Примітка: * – відмінності статистично значущі між температурами -80 та 5°C ; # – відмінності статистично значущі між температурами -80 та -20°C ($p < 0,05$; $n = 5$).

5.3. Вплив процесу ліофілізації і складу захисних середовищ на інфекційну активність вірусу сказу

Перед проведенням експериментів із ліофілізації було досліджено збереженість ВС після інкубації у захисних середовищах 1–4. Штам ВС L. Pasteur суспендували у РС (контроль) та у захисних середовищах 1–4. Зразки інкубували за кімнатної температури протягом 2-х годин. Встановлено, що внесення у РС сахарози, желатину та їх комбінацій у концентраціях, вказаних в розділі 2

«Матеріали й методи дослідження», і інкубація в цих середовищах протягом 2-х годин не впливають на інфекційну активність ВС (табл. 5.3.1).

Таблиця 5.3.1

Інфекційна активність штаму ВС L. Pasteur після інкубації в захисних середовищах для ліофілізації

Захисне середовище	Термін інкубації	Інфекційна активність, lg CCID ₅₀	% від контролю
Контроль РС	До інкубації	5,24±0,12	100,00
	2 год.	5,21±0,15*	99,42
№ 1 РС + 5% сахарози	До інкубації	5,21±0,09	100,00
	2 год.	5,25±0,15*	100,76
№ 2 РС + 3% желатина + 5% сахарози	До інкубації	5,28±0,12	100,00
	2 год.	5,28±0,18*	100,00
№ 3 РС + 1% желатина + 5% сахарози	До інкубації	5,16±0,12	100,00
	2 год.	5,19±0,08*	100,58
№ 4 РС + 10% сахарози	До інкубації	5,19±0,23	100,00
	2 год.	5,12±0,15*	98,65

Примітка: * – інфекційна активність значуще не відрізняється від контролю ($p > 0,05$; $n = 5$).

Під час дослідження впливу процесу ліофілізації і складу захисних середовищ на інфекційну активність вірусу сказу були отримані наступні результати. Вихідним контролем вважали інфекційну активність вірусу в РС до ліофілізації (далі – вихідна інфекційна активність вірусу), яка становила (5,38±0,15) lg CCID₅₀ (рис. 5.3.1). Після ліофілізації в усіх зразках було виявлено значуще зниження інфекційної активності вірусу порівняно з вихідною. Найвищий показник інфекційної активності був встановлений у зразках, ліофілізованих в середовищі 3 (91% від вихідної активності). У препаратах, ліофілізованих у середовищах 1, 2 та 4, показники інфекційної активності були

значуще нижчими, ніж в середовищі 3, та складали 86, 81 та 84% від вихідної активності відповідно. Інфекційна активність вірусу у середовищі 1 була значуще вища за активність у середовищі 2. Статистично значущі відмінності у інфекційній активності ліофілізованого вірусу між зразками 1 та 4, 2 та 4 були відсутні.

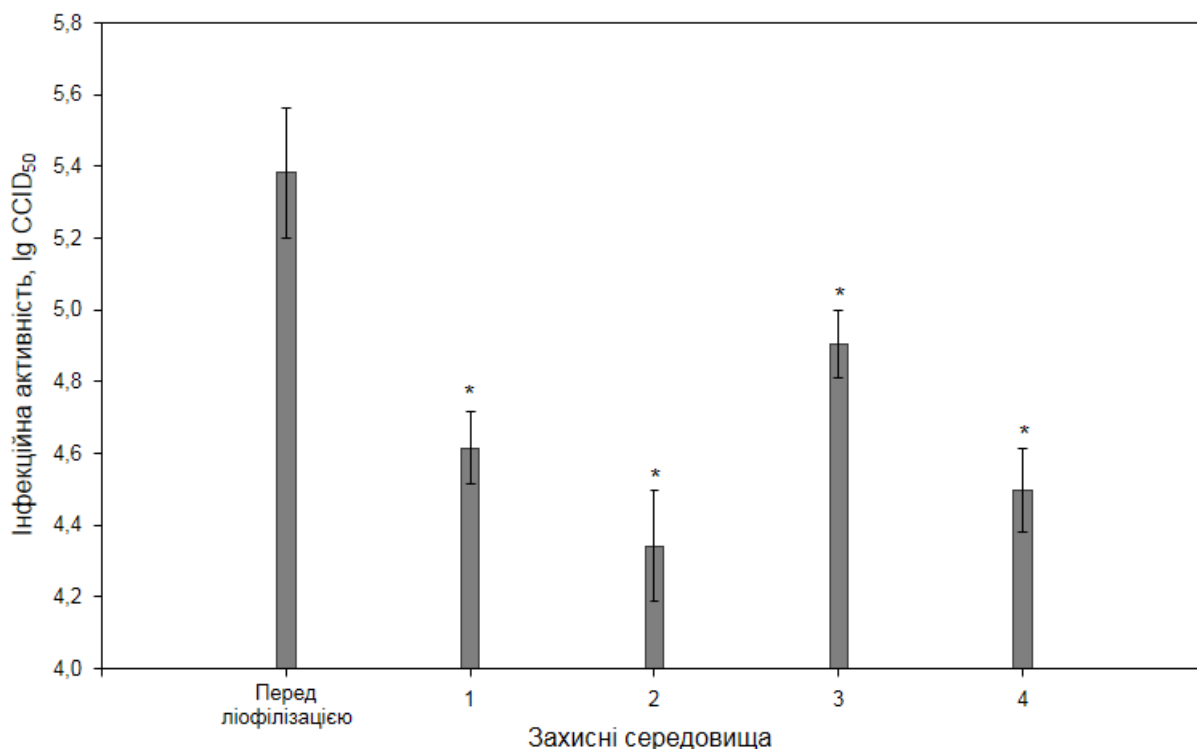


Рис. 5.3.1. Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur після ліофілізації у різних захисних середовищах.

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівнянно із інфекційною активністю вірусу перед ліофілізацією ($p < 0,05$; $n = 5$).

5.4. Вплив температурних умов зберігання та складу захисних середовищ на інфекційну активність ліофілізованого вірусу сказу

Було встановлено, що на інфекційну активність ліофілізованого вірусу, який зберігався протягом 24-х місяців, у різні терміни зберігання у різній мірі впливали температура, термін зберігання та склад захисного середовища. Статистичний аналіз даних показав, що через 6 місяців ступінь впливу захисного середовища був вище, ніж температурних умов зберігання, через 12 місяців ці фактори мали

однаковий вплив, а через 18 та 24 місяці температура зберігання була визначальним чинником.

За вихідний контроль у цьому розділі досліджень були показники інфекційної активності вірусу безпосередньо після процесу ліофілізації перед розміщенням на зберігання. Також порівнювали показники інфекційної активності вірусу в процесі зберігання з показниками в попередній термін зберігання за кожної із температур. Так, після 6-місячного зберігання (рис. 5.4.1) при -80°C активність вірусу не змінювалась порівняно з контролем у всіх середовищах, при -20°C – у середовищах 1–3. У середовищі 4 при -20°C та в усіх середовищах при 5°C інфекційна активність вірусу була значуще нижче вихідного контролю.

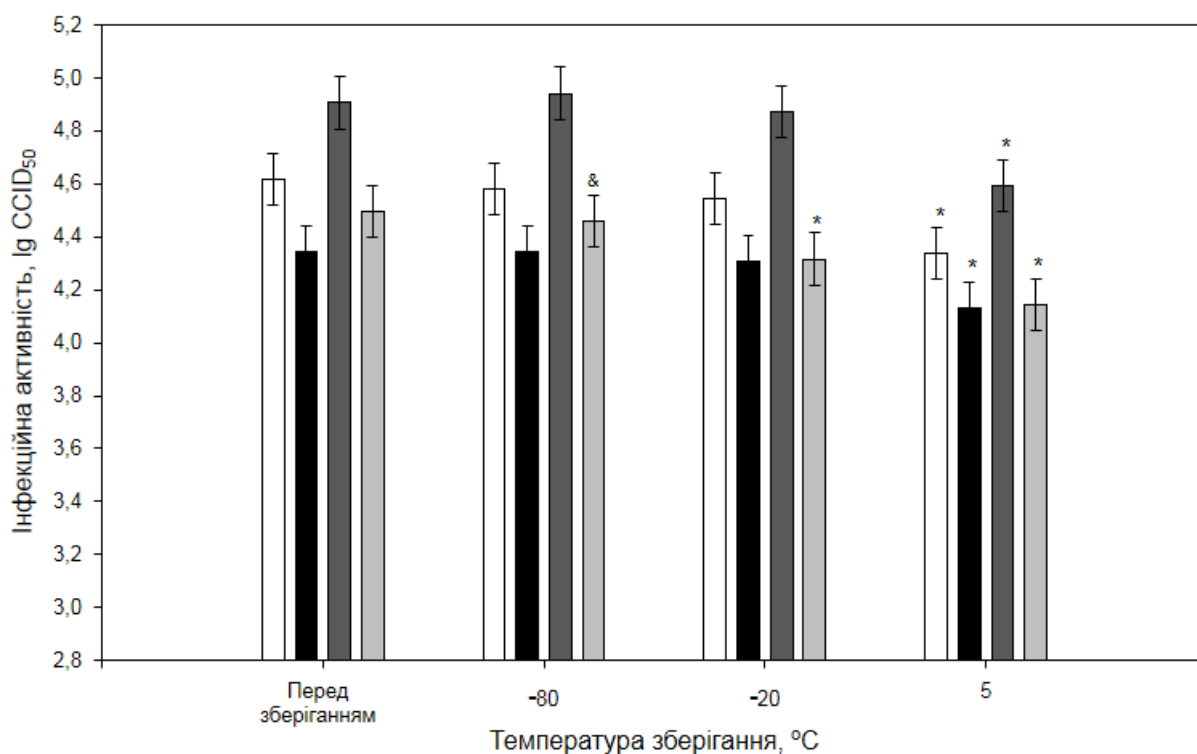


Рис. 5.4.1. Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur, ліофілізованого у різних середовищах, після зберігання за температур 5, -20 та -80°C протягом 6-ти місяців: □ – середовище 1; ■ – середовище 2; ■ – середовище 3; □ – середовище 4.

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно із активністю перед зберіганням; & – інфекційна активність при -80°C значуще вища, ніж при -20°C ($p < 0,05$; $n=5$).

Через 12 місяців (рис. 5.4.2) зберігання показники інфекційної активності вірусу в усіх зразках залишалися на попередньому рівні.

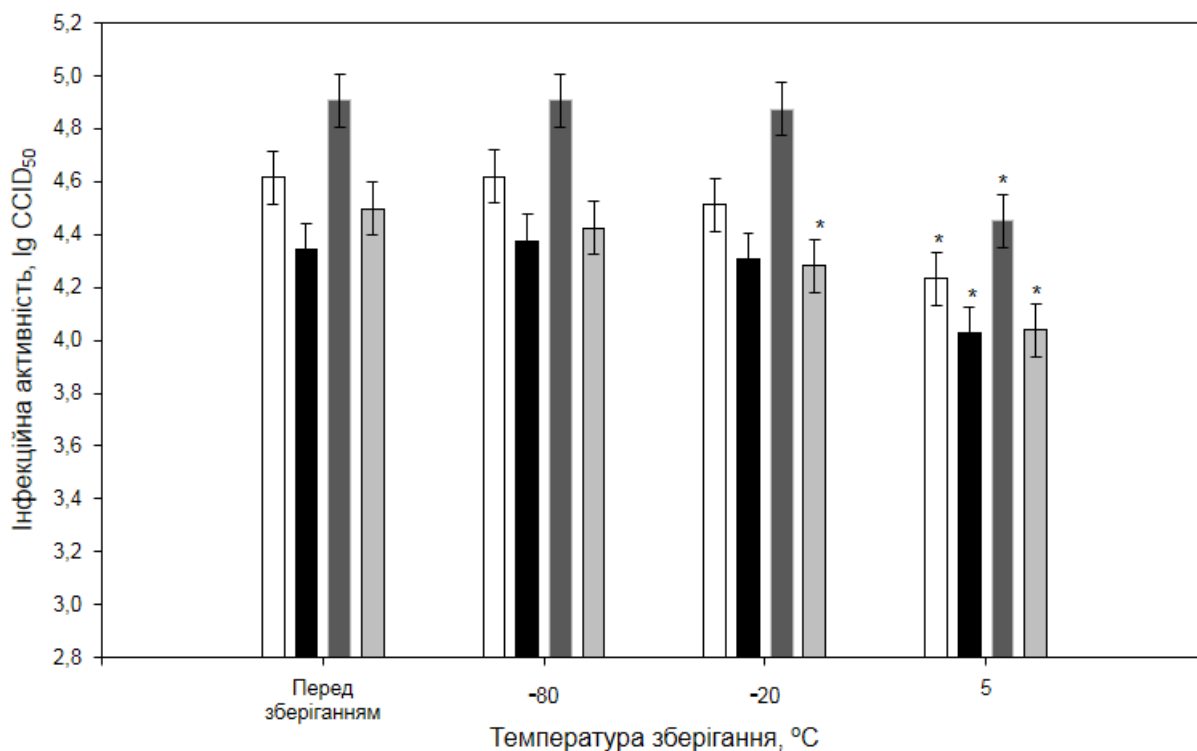


Рис. 5.4.2 . Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur, ліофілізованого у різних середовищах, після зберігання за температур 5, -20 та -80°C протягом 12-ти місяців: □ – середовище 1; ■ – середовище 2; ■ – середовище 3; □ – середовище 4.

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з активністю перед зберіганням ($p < 0,05$; $n = 5$).

Через 18 місяців зберігання (рис. 5.4.3) в усіх препаратах було встановлено зниження інфекційної активності вірусу порівняно з попереднім терміном зберігання та порівняно з вихідним контролем, крім зразків, які ліофілізували у середовищі 2 і зберігали при -80°C.

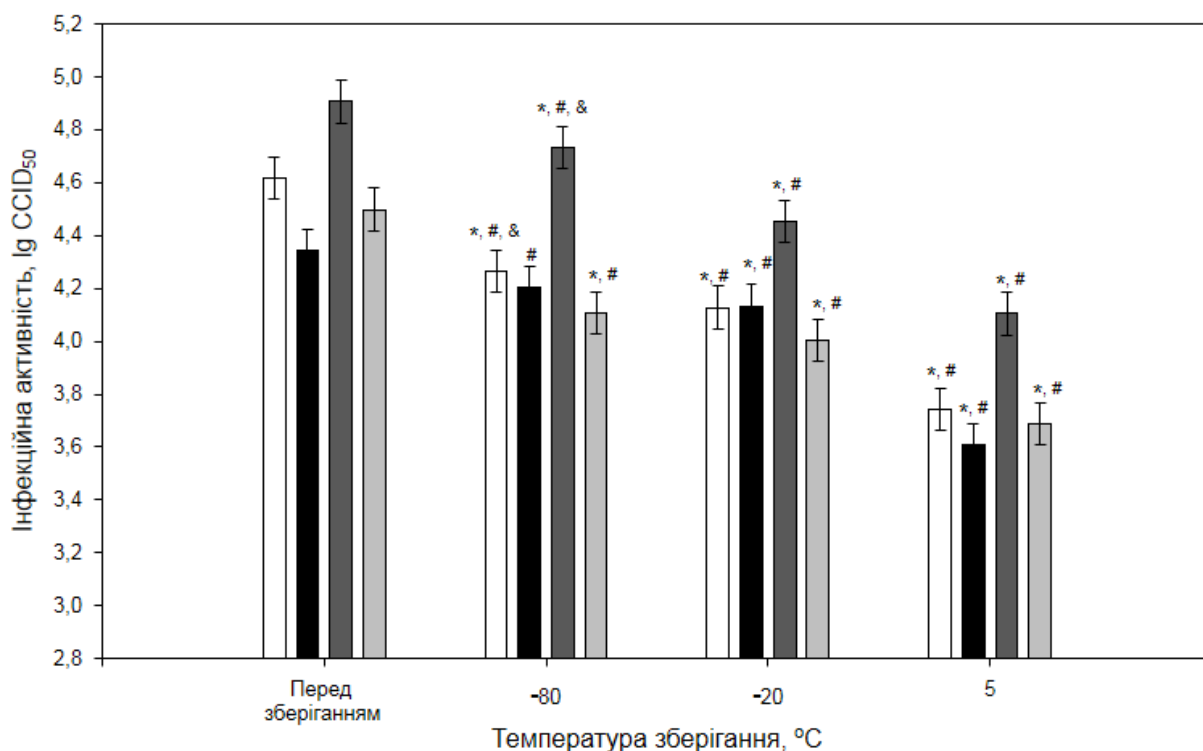


Рис. 5.4.3. Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur, ліофілізованого у різних середовищах, після зберігання за температур 5, -20 та -80°C протягом 18-ти місяців: □ – середовище 1; ■ – середовище 2; ■ – середовище 3; ■ – середовище 4.

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з активністю перед зберіганням; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання; & – інфекційна активність при -80°C значуще вища, ніж при -20°C ($p < 0,05$; $n=5$).

Після зберігання протягом 24-х місяців (рис. 5.4.4) спостерігали подальше значуще зниження інфекційного титру порівняно з 18-ти місячним терміном зберігання у зразках з середовищами 2–4 при -20°C та з усіма середовищами при 5°C . У інших зразках інфекційна активність вірусу значуще не змінювалась. На всіх термінах зберігання інфекційна активність зразків вірусу, які зберігалися при 5°C , була нижче порівняно з препаратами, які зберігалися при -20 та -80°C . Значуща різниця між температурними режимами -20 та -80°C була виявлена через 6 місяців у середовищі 4, через 18 місяців – у середовищах 1 та 3, через 24 місяці – у середовищах 3 та 4. У цих випадках температура -80°C була більш

ефективною, в інших – різниця між показниками інфекційної активності вірусу в зразках, які зберігали при -20 та -80°C була відсутня.

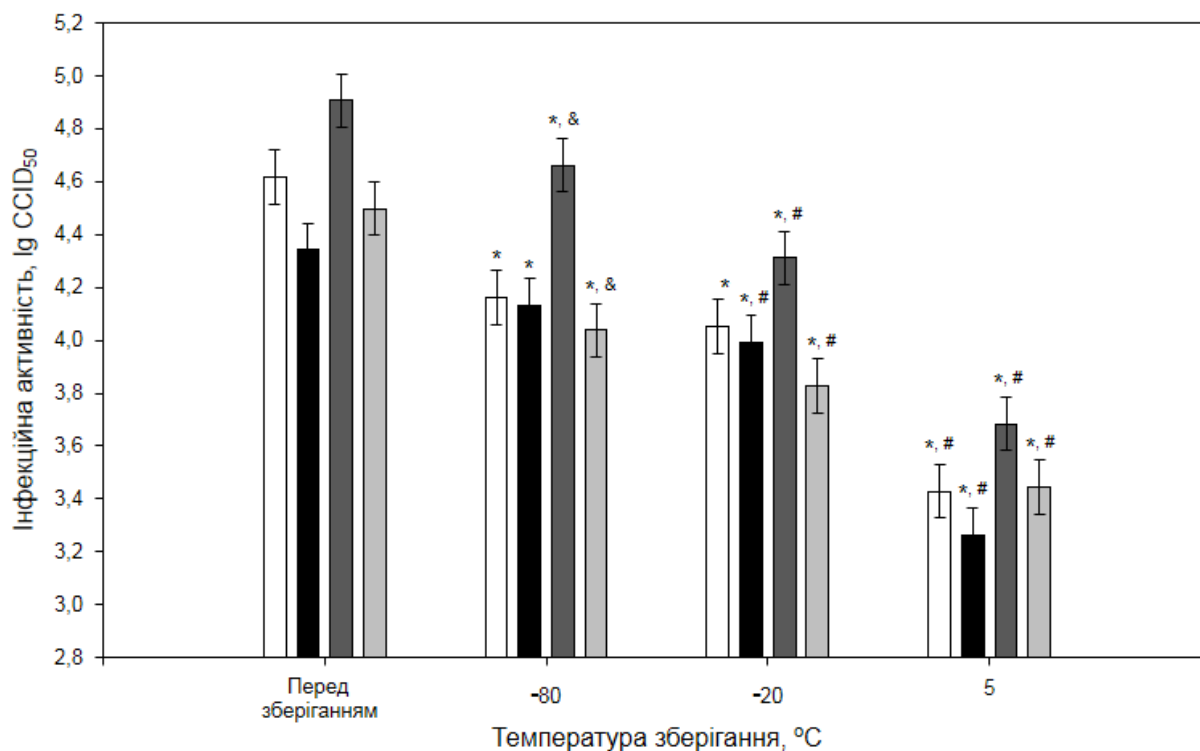


Рис. 5.4.4. Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur, ліофілізованого у різних середовищах, після зберігання за температур 5, -20 та -80°C протягом 24-х місяців: □ – середовище 1; ■ – середовище 2; ■ – середовище 3; □ – середовище 4.

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з активністю перед зберіганням; # – відмінності статистично значущі порівняно з попереднім терміном зберігання; & – інфекційна активність при -80°C значуще вища, ніж при -20°C ($p < 0,05$; $n = 5$).

Через 24 місяці зберігання показники інфекційної активності вірусу також порівнювали з активністю вірусу до ліофілізації. В ході статистичного аналізу ступеня впливу захисних середовищ на збереженість ліофілізованого вірусу було встановлено, що за всіх досліджуваних температур (5, -20 , -80°C) протягом всього терміну спостереження найвищий захисний ефект надавало середовище 3 (табл. 5.4.1). Через 24 місяці при 5°C у цьому середовищі збереглося 68% від інфекційної активності до ліофілізації, при -20°C – 80%, при -80°C – 87%.

Таблиця 5.4.1

Інфекційна активність вірусу сказу штаму L. Pasteur, ліофілізованого у різних середовищах, порівняно з інфекційною активністю вірусу до ліофілізації, %

Захисне середовище	Перед зберіганням	Термін збер., міс.	6	12	18	24
		Темп. збер., °С				
1	86	5	81	79	70	64
		-20	84	84	77	75
		-80	85	86	79	77
2	81	5	77	75	67	61
		-20	80	80	77	74
		-80	81	81	78	77
3	91	5	85*	83*	76*	68*
		-20	91*	91*	83*	80*
		-80	92*	91*	88*	87*
4	84	5	77	75	69	64
		-20	80	80	74	71
		-80	83	82	76	75

Примітка: * – інфекційна активність значуще вище, ніж в інших захисних середовищах ($p < 0,05$; $n=5$).

Отримані результати свідчать про значну роль складу захисних середовищ у процесі ліофілізації та наступного зберігання ліофілізованого вірусу сказу за різних температур. Це пов'язано із особливостями будови складних вірусів, у тому числі вірусу сказу. Переважаючими структурними компонентами його будови є білки та сполуки білків: двошарова ліпопротеїнова оболонка, матричний білок М, глікопротеїнові шипи G, РНК-залежна РНК-полімераза, транскриптаза, нуклеопротеїн, пов'язаний із геномною РНК, L-білок [1–5, 7, 10, 13, 15, 17, 23, 24, 48, 60, 111, 118]. Усі ці структурні компоненти є мішенями для пошкоджувальних

фізико-хімічних факторів, які супроводжують етапи процесу ліофілізації (охолодження, відігрів, сублімація, досушування, зберігання зневоднених віріонів). Ці пошкоджувальні фактори впливають на третинну та четвертинну структури білків і сполук білків. І тому саме склад захисних середовищ, їх іонна сила, діелектрична проникність, рН та буферна ємність суттєво впливають на збереженість гідрофобних взаємодій і водневих зв'язків, що стабілізують третинну та четвертинну структуру білкових компонентів віріонів. Отримані в наших експериментах із віріонами вірусу сказу результати багато в чому співпадають із результатами досліджень пошкоджувального впливу низьких температур на ізольовані білки [138, 236].

В процесі ліофілізації та зберігання ліофілізованих зразків на збереженість віріонів впливають наступні фізико-хімічні фактори. На етапі охолодження реалізуються «ефекти розчину» – концентрація солей та інших компонентів середовища консервування, зміни міжмолекулярних взаємодій та рН середовища, пов'язані із виморожуванням вільної води [139, 236–238]. В результаті дії цих факторів відбуваються дегідратація, агрегація та денатурація біомакромолекул [236, 238, 239–241]. Крім того, в результаті безпосереднього охолодження і пов'язаних з цим змін фізико-хімічних властивостей води та внутрішньомолекулярних взаємодій в біомакромолекулах відбуваються холодова інактивація, агрегація або розрихлення білкових глобул [138, 236, 239, 242–244]. На етапі сублімації, під час фазового переходу «лід-пара», за рахунок зневоднення зразків, у тому числі і сублімації вільної води безпосередньо із віріонів, також порушуються внутрішньомолекулярні взаємодії різних ділянок біополімерів, утворюються міжмолекулярні -S-S-зв'язки, що закінчується денатурацією білків та дестабілізацією вірусної РНК-залежної РНК-полімерази та транскриптази. На етапі досушування, коли видаляються фракції води, розташовані на поверхні структурних компонентів віріонів, порушується стабільність білкових молекул. В процесі зберігання ліофілізованих зразків у зв'язку з наявністю залишкової вологи (вільна та зв'язана вода) та кисню відбуваються окислювальні процеси [74, 95, 169, 170]. Тому на інфекційну активність ліофілізованого вірусу сказу в процесі

зберігання впливають і склад захисного середовища, і температурні режими зберігання.

Найбільший захисний ефект середовища 3 протягом 24-х місяців зберігання ліофілізованого вірусу за усіх досліджуваних температур (5, -20, -80°C), зумовлений, імовірно, наявністю двох захисних компонентів – 1% желатину та 5% сахарози. Відомо, що цукри здатні утворювати водневі зв'язки з полярними і зарядженими групами в міру віддалення води, що запобігає пошкодженню біомолекул віріонів у процесі ліофілізації [93, 185]. Желатин складається на 98% із білків та амінокислот [245]. Білки стабілізують структурні компоненти вірусної частки, перешкоджають злипанню віріонів і зміні рН середовища [92, 105]. Така поєднана дія захисних механізмів зумовлює переваги середовища 3 перед цукровмісними середовищами 1 та 4.

Виразність захисного ефекту середовищ 2 і 3 пов'язана з концентрацією желатину в середовищах (3 та 1% відповідно). Оскільки всі зразки ліофілізували одночасно за одним технологічним регламентом сушки, то можна припустити, що матриця із середовища 2, яка формувалася під час сублімації, в меншій мірі запобігала руйнуванню вірусних часток на всіх технологічних етапах (сублімація та подальше зберігання).

Наявність вільної та зв'язаної води в зразках ліофілізованого ВС грає важливу роль стосовно збереженості вірусу від температурних режимів зберігання. В процесі зберігання при 5 та -20°C наявність охолодженої та переохолодженої навколишньої води сприяє хімічним і біохімічним реакціям, які призводять до інактивації вірусу. При -80°C закінчується кристалізація зв'язаної води, і віріони знаходяться у стані, близькому до анабіозу.

За матеріалами розділу 5 опубліковані роботи [246–248].

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

До теперішнього часу сказ є актуальною проблемою для більш, ніж 150-ти країн світу, у тому числі і для України [8, 14, 18–20]. Україна посідає третє місце в Європі з поширення сказу серед диких та домашніх тварин. Кожного року в Україні реєструють випадки підозри на інфікування та захворювання людей на сказ [33, 112, 113]. Для профілактики та контролю за поширенням сказу у тварин проводять пероральну імунізацію диких та парентеральну імунізацію домашніх тварин. У людей з підозрою на інфікування проводять постекспозиційну профілактику сказу антирабічними вакцинами та специфічними імуноглобулінами. Також вакцинують людей з високим ризиком інфікування в умовах виконання професійних обов'язків [33–35].

Сучасне серійне виробництво антирабічних препаратів потребує тривалого зберігання великих об'ємів очищених та стандартизованих суспензій промислових штамів вірусу сказу та в меншій мірі – їх ліофілізатів. Для цього в технологічні схеми виробництва введена система головного та робочого банків вірусу [27, 41, 63]. Стабільність вірусних суспензій в ході їх зберігання має важливе значення для безперервного забезпечення виробництва посівним матеріалом, проведення контролю якості антирабічних вакцин та імуноглобулінів, гарантії надійності серологічних методів діагностики [64–74]. Наявність дефектних часток у суспензії вірусу є небажаною складовою у виробництві вакцин [64, 65, 73, 75], тому що імуногенність цих препаратів залежить від активності вірусу, який використовується для її виготовлення [74]. Ліофілізовані зразки призначені для депонування промислових штамів вірусу сказу та для їх дублювання у головному банку виробництва [76]. У зв'язку з вищевикладеним набула актуальності проблема розробки ефективних методів довгострокового зберігання суспензій та ліофілізатів промислових штамів вірусу сказу в умовах виробництва антирабічних препаратів.

Головними методами зберігання більшості вірусів у дослідницьких і виробничих цілях є ліофілізація та заморожування до помірно низьких і низьких температур із застосуванням захисних середовищ [69, 72, 77–85].

На сьогодні дослідження щодо зберігання за різних низьких температур та ліофілізації ВС мають фрагментарний характер. Більшість із них присвячена короткостроковому зберіганню вірусу. Відсутні порівняльні дані щодо впливу температурних режимів, складу середовищ консервування та термінів зберігання на ВС у процесі довгострокового зберігання.

У зв'язку з вищевикладеним дослідження впливу складу середовищ консервування, температурних режимів і термінів зберігання за низьких температур і після ліофілізації на інфекційну активність промислових штамів вірусу сказу має значення для вивчення механізмів кріопшкоджень, кріозахисту та ангідробіозу складних вірусів і дозволяє вирішити і удосконалити ряд технологічних етапів виробництва антирабічних препаратів.

Результати, отримані в ході дослідження впливу складу захисних середовищ і температурних режимів зберігання за низьких температур та після ліофілізації на збереженість ВС свідчать про значну роль складу захисних середовищ під час зберігання за низьких температур і в процесі ліофілізації та наступного зберігання за різних температур вірусу сказу. Це пов'язано із особливостями будови складних вірусів, у тому числі вірусу сказу. Переважаючими структурними компонентами його будови є білки та сполуки білків: двошарова ліпопротеїнова оболонка, матричний білок М, глікопротеїнові шипи G, РНК-залежна РНК-полімераза, транскриптаза, нуклеопротеїн, пов'язаний із геномною РНК, L-білок [1–5, 7, 10, 13, 15, 17, 23, 24, 48, 60, 111, 118].

Усі ці структурні елементи віріонів складних вірусів є мішенями для пошкоджувальної дії фізико-хімічних факторів, які супроводжують етапи заморожування-відтавання, зберігання за різних низьких температур, процесу ліофілізації і зберігання у ліофілізованому стані. Особливості будови віріонів складних вірусів, у тому числі ВС, дозволяють виключити із механізмів кріопшкоджень ВС ряд процесів які мають місце під час кріопшкоджень клітин.

Ці процеси описані в «теорії мінімального об'єму» Г.Т. Мерімена [134–136], у «двофакторній теорії кріпошкоджень» П. Мейзура [86, 142–145], гіпотезі «мембранного пошкодження» П.Д. Квіна [137]. Відповідно, для характеристик захисної дії кріопротекторних речовин під час заморожування та ліофілізації вірусів не підходить їх класифікація на проникаючі, непроникаючі та кріопротектори змішаного типу.

В проведеному дослідженні зразки ВС заморожували до -20 та -80°C з повільними швидкостями охолодження на полицях морозильних камер з відповідними температурами та до -196°C шляхом занурення у рідкий азот (швидке охолодження). Аналіз показників інфекційної активності ВС після етапів заморожування та зберігання за низьких температур показав, що на збереженість вірусу впливали склад середовищ консервування, швидкість охолодження, температура та терміни зберігання. На етапах охолодження та зберігання ВС найбільш вірогідними були наступні пошкоджувальні фактори. Під дією низьких температур (температурний фактор) могли відбуватися розпушення і агрегація білків нуклеокапсиду та пошкодження вірусної РНК-залежної РНК-полімерази [71, 73, 96, 243]. Внаслідок ліотропної і хаотропної дії цих розчинів порушувалися гідрофобні та водневі зв'язки, витіснялася зв'язана вода з гідратних оболонок білків та інших полімерів, змінювалися рН та діелектрична проникність. Це призводило до змін конформації молекул полімерів віріонів. Внаслідок контакту віріонів із кристалами льоду, які зростали, частина із них гинула під дією кристалізаційного тиску [138, 229, 230, 236]. Не виключається захват віріонів у замкнений простір у кристалах льоду, де на них впливає гіпербаричний тиск, як це було показано в дослідях на бактеріофагах *E. coli* [157, 158]. На етапі відтавання до зони фазових перетворень води кріпошкодження ВС пов'язані з термомеханічними напруженнями та «докристалізацією» рідкої фази, а в зоні фазових перетворень – із рекристалізацією [72, 80, 103, 104, 249].

Враховуючи, що діапазон температур від -10 до -80°C відповідає зоні кристалізації охолодженої та переохолодженої води [228, 249], і, з огляду на багатоконпонентність середовищ консервування та значення евтектичних

температур для розчинів різних електролітів і кріопротекторів [138], можна припустити: віріони в процесі зберігання при -20°C постійно перебували у рідкій фазі в мікроканалах між кристалами льоду і піддавалися впливу сукупності факторів (гіперконцентрація солей та інших компонентів; зміна рН середовища; дегідратація макромолекул; порушення міжмолекулярних взаємодій. З подовженням термінів зберігання при -20°C відбувалося подальше збільшення кристалів льоду з підвищенням концентрації солей та інших компонентів, що посилювало «ефекти розчинів» [229, 230, 249].

У зразках, що зберігалися при -80°C , на вірус впливали ті ж фізико-хімічні чинники. Більшою мірою вони викликали пошкодження віріонів на етапах охолодження-відігріву [100]. Усі використані в дослідженнях захисні середовища являли собою багатокомпонентні системи із структурною гетерогенністю та мали розмиту зону кристалізації впритул до -80°C з термодинамічною нестабільністю, очевидно, що за температури -80°C в них зберігалися рідкі мікрофази, що містили рідкі розчини солей та кріопротекторів. Ці гіперконцентровані розчини і пошкоджували віріони в процесі зберігання при -80°C .

Аналізуючи криві зниження інфекційної активності після зберігання протягом терміну спостереження, ми припускаємо, що мали місце два процеси. Перший – безпосередня загибель віріонів у процесі зберігання внаслідок дії низької температури і «ефектів розчинів». Другий – накопичення нелетальних і сублетальних кріопошкоджень у віріонах. Ці пошкодження реалізувалися на етапі відігріву при додатковому впливі пошкоджувальних фізико-хімічних факторів під час відтавання зразків [138, 249].

Під час зберігання протягом 24-х місяців за температури -196°C на збереженість ВС в умовах проведеного дослідження (швидке охолодження, усі середовища консервування із додаванням кріопротекторних домішок) значущий вплив виказував склад середовищ консервування.

Отримані у дослідженні результати показують, що кріозахисна дія середовищ консервування на етапах заморожування і зберігання за низьких температур також пов'язана із особливостями механізмів кріопошкоджень ВС.

Основою середовищ консервування вірусу було РС, яке складалося з DMEM із додаванням ростових факторів (СА ВРХ, СА людини, ФС ВРХ). РС, до складу якого входили неорганічні солі Са, Fe, Mg, К, Na, амінокислоти, комплекс вітамінів групи В, D-глюкоза, в певній мірі виконувало захисну функцію як під час заморожування, так і під час зберігання вірусу за низьких температур. Кріозахисна дія РС відносно ВС пов'язана з дією його складових. Сольові компоненти середовища підтримують його буферну ємність та осмотичний баланс [65, 80, 101]. Амінокислоти, ростові фактори, вітаміни групи В стабілізують суперкапсид ВС [99, 105] D-глюкоза, як і інші моносахариди, формує водневі зв'язки своїх гідроксильних груп з білком і ліпідами суперкапсиду, чим стабілізує його структуру. Її розчини мають більш високу в'язкість із пониженням температури нижче 0°C і низьку евтектичну температуру, за рахунок чого впливають на форму і розміри каналцівнезамерзаючої фракції води [229, 230].

У якості кріопротекторних домішок в середовища консервування вносили в різних концентраціях сахарозу, гліцерин, ДМСО, желатин, ефективність яких була показана під час заморожування різних вірусів, та альгінат натрію і пептон, які використовують під час консервування бактерій і дріжджів. Гліцерин утворює водневі зв'язки з молекулами води і стабілізує гідратну структуру навколо білків, викликає збільшення кількості правообертальних структур в білках, чим підвищується жорсткість молекул білків. Це запобігає денатурації білків під час заморожування. Гліцерин проявляє виражену колігативну дію. В його розчинах зменшується кількість льоду, під час фазового переходу формуються дрібнокристалічні структури льоду із переходом в аморфний стан, зменшується концентрація сольових розчинів [71, 101, 103, 114, 175, 187]. Сахароза за рахунок гідратації зменшує кількість вільної води, збільшує в'язкість розчинів в каналцях і знижує температуру їх замерзання, чим сприяє переходу оточуючого віріони середовища в сан вітрифікації [65, 71, 84, 93, 94, 101, 102, 162, 185]. ДМСО також впливає на процеси зародкоутворення кристалів льоду, сприяє формуванню дрібних кристалів льоду, забезпечує колігативний ефект, взаємодіє з іншими

речовинами, підсилюючи їх кріозахисну дію [71, 101, 103, 175, 187]. Желатин на 98% складається з білків, амінокислот та незначних домішок вуглеводів, мікро- і макроелементів [245]. Його кріопротекторну дію пов'язують із формуванням високов'язкої аморфної матриці з гідрофільними властивостями. Це сприяє зменшенню вираженості кристалізаційних процесів і переходу в стан вітрифікації [79, 101]. Пептон модифікує процеси кристалоутворення, фіксується на поверхні клітин бактерій та дріжджів [80, 101]. Механізми взаємодії цієї речовини з віріонами невідомі. Альгінат натрію – натрієва сіль альгінових кислот. Його водні розчини під час пониження температури переходять у стан гелю. Кріопротекторну дію альгінату натрію пов'язують із утворенням гелевої матриці, яка змінює характер кристалізації, зміщує початок фазових перетворень в зону більш низьких температур та виконує функцію механічного бар'єру між кристалами льоду [181–184].

Аналіз захисної дії середовищ консервування із додаванням кріопротекторних домішок, проведений у розділі 3, свідчить про те, що при заморожуванні та низькотемпературному зберіганні ВС захисну дію кріопротекторних речовин пов'язано, з одного боку, із їхніми гідратаційними властивостями, з іншого – здатністю запобігати структурним перебудовам білкових макромолекул шляхом стабілізації системи водневих зв'язків або за рахунок сорбції на поверхні віріонів зі стабілізацією суперкапсиду [71, 73, 96, 143, 243].

Вираженість захисної дії середовищ консервування під час зберігання за температур -20 , -80°C змінювалася і залежала від температурного режиму і термінів зберігання.

Слід відмітити, що пептон проявив інактивуючу дію на ВС як на етапах заморожування, так і в процесі зберігання за низьких температур. Найбільш вирогідно це викликано агрегацією віріонів під дією пептону та низьких температур.

Другою складовою дисертаційної роботи було встановлення впливу складу захисних середовищ на інфекційну активність ВС після ліофілізації та наступного

зберігання за температур 5, –20, –80°C. Процес ліофілізації складається із трьох етапів, під час яких біологічні об'єкти пошкоджуються за рахунок дії низки взаємопов'язаних фізико-хімічних факторів: заморожування, сублімація, досушування [65, 72, 82, 84, 93, 95, 102, 106, 163].

В процесі ліофілізації та зберігання ліофілізованих зразків на збереженість віріонів впливають наступні фізико-хімічні фактори. На етапі охолодження реалізуються «ефекти розчину» – концентрація солей та інших компонентів середовища консервування, зміни міжмолекулярних взаємодій та рН середовища, пов'язані із виморожуванням вільної води [139, 236–238, 249]. В результаті дії цих факторів відбуваються дегідратація, агрегація та денатурація біомакромолекул [236, 238–241]. Крім того, в результаті безпосереднього охолодження і пов'язаних з цим змін фізико-хімічних властивостей води та внутрішньомолекулярних взаємодій в біомакромолекулах відбуваються холодова інактивація, агрегація або розрихлення білкових глобул [138, 236, 239, 242–244, 249]. На етапі сублімації, під час фазового переходу «лід-пара», за рахунок зневоднення зразків, у тому числі і сублімації вільної води безпосередньо із віріонів, також порушуються внутрішньомолекулярні взаємодії різних ділянок біополімерів, утворюються міжмолекулярні -S-S-зв'язки, що закінчується денатурацією білків та дестабілізацією вірусної РНК-залежної РНК-полімерази та транскриптази. На етапі досушування, коли видаляються фракції води, розташовані на поверхні структурних компонентів віріонів, порушується стабільність білкових молекул.

В процесі зберігання ліофілізованих зразків за рахунок наявності залишкової вологи (вільна та зв'язана вода) та кисню відбуваються реакції вільнорадикального окислення, які прозводять до пошкодження білків віріонів, ліпідів суперкапсиду та вірусної РНК [74, 95, 169, 170].

Отримані результати свідчать про те, що склад захисного середовища відіграє ключові роль у збереженості ВС під час ліофілізації та наступного зберігання. Оскільки ліофілізацію на виробництві проводять на серійних промислових установках, змінювати режими заморожування, сублімації та

досушування технічно майже неможливо. Пакування ліофілізатів та температурні режими зберігання теж мають свої технологічні регламентні обмеження.

В експериментах із ліофілізації ВС було встановлено, що найвищий захисний ефект у процесі ліофілізації та наступного зберігання протягом 24-х місяців за температур 5, -20 , -80°C проявило захисне середовище на основі РС із додаванням 1% желатину та 5% сахарози. Найбільш імовірно, що захисна дія цього середовища пов'язана з наявністю саме цих компонентів.

На етапі заморожування зразки, які ліофілізують, являють собою заморожену суспензію віріонів у захисному середовищі. На етапі сублімації зразки складаються з кристалів льоду та аморфної маси розчинених у РС кріопротекторів, в яку включено віріони. На етапі осушування ці зразки є твердою аморфною масою з віріонами. Механізми захисної дії сахарози, желатину та РС, основним із яких є стабілізація структурних компонентів віріонів, описані вище.

Наявність вільної та зв'язаної води в зразках ліофілізованого ВС грає важливу роль стосовно збереженості вірусу від температурних режимів зберігання. В процесі зберігання при 5 та -20°C наявність охолодженої та переохолодженої навколишньої води сприяє хімічним реакціям, які призводять до інактивації вірусу. При -80°C закінчується кристалізація зв'язаної води, і віріони знаходяться у стані, близькому до анабіозу.

Таким чином проведене дослідження дозволило встановити вплив на ВС пошкоджувальних фізико-хімічних факторів, які супроводжують процеси заморожування і ліофілізації та зберігання за низьких температур у різних середовищах консервування. На основі отриманих результатів були розроблені протоколи довгострокового зберігання за температур -80 , -196°C , короткострокового (до 6-ти місяців) зберігання за температури -20°C , ліофілізації та наступного зберігання за температур 5, -20 , -80°C промислових штамів вірусу сказу.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової задачі, яка спрямована на визначення ефективних умов довгострокового зберігання промислових штамів вірусу сказу в технологічних процесах виробництва антирабічних препаратів.

Отримані результати порівняльного дослідження впливу складу захисних середовищ, температурних режимів і термінів зберігання на збереженість вірусу сказу дозволяють зробити наступні висновки:

1. На відміну від концепцій щодо механізмів кріопошкоджень клітин пошкоджувальними факторами вірусу сказу переважно є «ефекти розчинів», агрегація та контакт віріонів із кристалами льоду. З цими особливостями механізмів кріопошкоджень пов'язана й вираженість захисної дії різних кріопротекторних речовин під час довгострокового зберігання вірусу сказу за низьких температур і після ліофілізації. Виявлено також відмінності у чутливості штамів CVS та L. Pasteur, які мають спільне походження, до умов зберігання за низьких температур.

2. Речовини з кріопротекторними властивостями, які використовують під час низькотемпературного консервування різних мікроорганізмів (сахароза, гліцерин, ДМСО, пептон у концентраціях до 10%, мальтоза в концентрації 5%, желатин, альгінат натрію в концентраціях до 3%) не впливають на інфекційну активність вірусу сказу. З урахуванням технологічних умов виробництва антирабічних препаратів для експериментального обґрунтування складу захисних середовищ було вибрано ростове середовище на основі DMEM із додаванням вказаних речовин.

3. Вираженість захисної дії кріопротекторних домішок у середовищах консервування відносно штамів CVS та L. Pasteur була різною на етапах заморожування до -20 , -80°C і змінювалася у процесі зберігання за цих температур. Так, після заморожування до -20°C максимальні показники збереженості штаму CVS були в середовищах із додаванням 2,5–7,5% сахарози,

2,5–5% гліцерину, 2,5–10% ДМСО, 1–3% желатину та 1–3% альгілату натрію, після наступного зберігання протягом 12-ти місяців – у середовищах із додаванням 5–10% сахарози, 5–7,5% гліцерину, 3% желатину. Максимальні показники збереженості штаму *L. Pasteur* після заморожування до -20°C були у середовищі з додаванням 7,5–10% сахарози, 2,5–10% гліцерину, 5–7,5% ДМСО, 1–3% желатину та у ростовому середовищі без домішок, після наступного зберігання протягом 12-ти місяців – у середовищах із додаванням 5–10% сахарози, 5–7,5% гліцерину, 5% ДМСО. Після заморожування до -80°C максимальні показники збереженості штаму CVS були у середовищах із додаванням 2,5% сахарози, 2,5% гліцерину, 10% ДМСО та 1–3% желатину, після зберігання протягом 12-ти місяців – у середовищах із додаванням 2,5–10% сахарози, 7,5% гліцерину, 5% ДМСО та 3% желатину. Максимальні показники збереженості штаму *L. Pasteur* після заморожування до -80°C були у середовищах із додаванням 10% сахарози, 10% гліцерину, 5–10% ДМСО, 1–3% желатину, 1–3% альгілату натрію та у ростовому середовищі без домішок, після зберігання протягом 12-ти місяців – у середовищах із додаванням 2,5–10% сахарози, 7,5% гліцерину, 2,5–7,5% ДМСО, 1–3% желатину та у ростовому середовищі без домішок.

4. На основі результатів досліджень збереженості інфекційної активності вірусу сказу за різних температур та результатів проведеного скринінгу складу захисних середовищ, які відповідають технічним умовам виробництва антирабічних препаратів, розроблено протоколи довгострокового зберігання виробничих штамів вірусу сказу за температур -80 , -196°C та короткострокового (до 6-ти місяців) за температури -20°C . Для довгострокового зберігання рекомендовано захисне середовище на основі ростового середовища DMEM із додаванням 5% сахарози, 5% гліцерину або їх суміші. Ці захисні середовища через 24 місяці (термін спостереження) забезпечують наступну збереженість інфекційної активності штамів CVS та *L. Pasteur*: 80–83 і 71–74% відповідно (-80°C) та 94 і 83–87% відповідно (-196°C). Для короткострокового зберігання рекомендовано ростове середовище на основі DMEM із додаванням 2,5–10%

сахарози або гліцерину. Через 6 місяців за температури -20°C у цьому середовищі зберігається 80–84% інфекційної активності штаму CVS та 80–88% – штаму L. Pasteur.

5. Ступінь впливу температур зберігання та складу захисних середовищ на інфекційну активність ліофілізованого за технологічним регламентом вірусу сказу змінюється залежно від термінів зберігання. У процесі зберігання протягом 24-х місяців (термін спостереження) через 6 місяців визначальним чинником був вплив складу захисних середовищ, через 12 місяців спостерігався однаковий вплив обох чинників, через 18–24 місяці більшим був вплив температури зберігання. Експериментально визначено склад захисного середовища для ліофілізації вірусу сказу та подальшого зберігання ліофілізованих зразків за температур 5, -20 та -80°C : ростове середовище на основі DMEM із додаванням суміші 1% желатину та 5% сахарози. Використання цього середовища дозволило зберегти після процесу ліофілізації 91% вихідної інфекційної активності штаму L. Pasteur. Після наступного зберігання протягом 24-х місяців за температур 5, -20 та -80°C збереглося 68, 80 та 87% вихідної інфекційної активності вірусу відповідно.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hooper DC. Rabies virus. In: Detrick B, Schmitz JL, Hamilton RG, editors. Manual of molecular and clinical laboratory immunology. 8th ed. Washington, DC: ASM Press; 2016. P. 665–73.
2. World Health Organization. WHO expert consultation on rabies: third report. Geneva: World Health Organization; 2018. 184 p.
3. World Health Organization. The immunological basis for immunization series. Module 17: Rabies. Geneva: World Health Organization; 2017. 40 p.
4. Orciari LA, Hanlon CA, Franka R. Chapter 94: Rabies Virus. In: Jorgensen JH, Pfaller MA, editors. Manual of Clinical Microbiology, 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015. P. 1633–1643. DOI:10.1128/9781555817381.ch94.
5. Dacheux L, Delmas O, Bourhy H. Human rabies encephalitis prevention and treatment: progress since Pasteur's discovery Infect Disord Drug Targets. 2011; 11(3): 251–99. PMID: 21488832.
6. Wu X, Smith TG, Rupprecht CE. From brain passage to cell adaptation: the road of human rabies vaccine development. Expert Rev Vaccines. 2011; 10(11): 1597–608. DOI: 10.1586/erv.11.140.
7. Yousaf MZ, Qasim M, Zia S, Khan Mu, Ashfaq UA, Khan S. Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment. Virol J. 2012; 9(1): 1–5. DOI: 10.1186/1743-422X-9-50.
8. El-Sayed A. Advances in rabies prophylaxis and treatment with emphasis on immunoresponse mechanisms. Int J Vet Sci Med. 2018; 6(1): 8–15. DOI: 10.1016/j.ijvsm.2018.05.001.
9. Fisher CR, Streicker DG, Schnell MJ. The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers. Nat Rev Microbiol. 2018; 16(4): 241–55. DOI: 10.1038/nrmicro.2018.11.
10. Fooks AR, Banyard AC, Horton DL, Johnson N, McElhinney LM, Jackson AC. Current status of rabies and prospects for elimination. The Lancet. 2014; 384(9951): 1389–99. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62707-5.

11. OIE. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2019. Paris: World Health Organization for Animal Health (OIE); 2019. P. 578–612.
12. Kaplan MM. Safety precautions in handling rabies virus. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. P. 3–8.
13. Tordo N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. P. 28–51.
14. Rupprecht CE, Nagarajan T, Ertl H. Current status and development of vaccines and other biologics for human rabies prevention. *Expert Rev Vaccines*. 2016; 15(6): 731–49. DOI: 10.1586/14760584.2016.1140040.
15. Singh R, Singh KP, Cherian S, Saminathan M, Kapoor S, Manjunatha Reddy GB, Panda S, Dhama K. Rabies – epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Vet Q*. 2017; 37(1): 212–51. DOI: 10.1080/01652176.2017.1343516.
16. Terryn S, Francart A, Rommelaere H, Stortelers C, Van Gucht S. Post-exposure treatment with anti-rabies VHH and vaccine significantly improves protection of mice from lethal rabies infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(8): e0004902. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004902.
17. Rupprecht CE, Fooks AR, Abela-Ridder B, editors. Laboratory techniques in rabies, volume 1, 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2018. 304 p.
18. Rupprecht CE, Dietzschold B. Rabies symptoms, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Trop Med Infect Dis*. 2017; 2(4): 1–4. DOI: 10.3390/tropicalmed2040059.
19. Picard-Meyer E, Robardet E, Moroz D, Trotsenko Z, Drozhzhe Z, Biarnais M, et al. Molecular epidemiology of rabies in Ukraine. *Arch Virol*. 2012; 157(9): 1689–98. DOI: 10.1007/s00705-012-1351-6.
20. Vigerelli H, Sciani JM, Jared C, Antoniazzi MM, Caporale GMM, da Silva ADCR, Pimenta DC. Bufotenine is able to block rabies virus infection in BHK-

21 cells. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2014; 20(1): 45. DOI: 10.1186/1678-9199-20-45.

21. Hampson K, Coudeville L, Lembo T, Sambo M, Kieffer A, Attlan M, et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS Negl Trop Dis* [serial online]. 2015; 9(4): 1–20. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003709.

22. Zahoor MA, Khurshid M, Qureshi R, Naz A, Shahid M. Cell culture-based viral vaccines: current status and future prospects. *Future Virol*. 2016; 11(7): 549–562. DOI: 10.2217/fvl-2016-0006.

23. Sugiyama M, Ito N. Control of rabies: epidemiology of rabies in Asia and development of new-generation vaccines for rabies. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2007; 30(5-6): 273–86. DOI: 10.1016/j.cimid.2007.05.007.

24. Zhu S, Guo C. Rabies control and treatment: from prophylaxis to strategies with curative potential. *Viruses*. 2016; 8(11): 1–23. DOI: 10.3390/v8110279.

25. Moreira BLC, Gimenez APL, Inagaki JMF, Raboni SM. Inactivated rabies vaccines: standardization of an in vitro assay for residual viable virus detection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020; 14(3): e0008142. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008142.

26. Garg R, Kaur M, Saxena A, Prasad R, Bhatnagar R. Alum adjuvanted rabies DNA vaccine confers 80% protection against lethal 50 LD₅₀ rabies challenge virus standard strain. *Mol Immunol*. 2017; 85: 166–73. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.02.011.

27. Kulkarni PS, Sahai A, Gunale B, Dhere RM. Development of a new purified vero cell rabies vaccine (Rabivax-S) at the serum institute of India Pvt Ltd. *Expert Rev Vaccines*. 2017; 16(4): 303–11. DOI: 10.1080/14760584.2017.1294068.

28. Takayama-Ito M, Nakamichi K, Kinoshita H, Kakiuchi S, Kurane I, Saijo M, Lim CK. A sensitive in vitro assay for the detection of residual viable rabies virus in inactivated rabies vaccines. *Biologicals*. 2014; 42(1): 42–7. DOI: 10.1016/j.biologicals.2013.11.003.

29. Xue X, Zheng X, Liang H, Feng N, Zhao Y, Gao Y, et al. Generation of recombinant rabies Virus CVS-11 expressing eGFP applied to the rapid virus neutralization test. *Viruses*. 2014; 6(4): 1578–89. DOI: 10.3390/v6041578.

30. Trabelsi K, Zakour MB, Kallel H. Purification of rabies virus produced in Vero cells grown in serum free medium. *Vaccine*. 2019;37(47): 7052–60. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.072.
31. Cleaveland S, Hampson K. Rabies elimination research: juxtaposing optimism, pragmatism and realism. *Proc Biol Sci*. 2017; 284(1869): 1–9. DOI: 10.1098/rspb.2017.1880.
32. Pérez O, Paolazzi CC. Production methods for rabies vaccine. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 1997; 18(5): 340–7. DOI: 10.1038/sj.jim.2900391.
33. Makovska IF, Nedosekov VV, Kornienko LY, Novokhatny YO, Nebogatkin IV, Yustyniuk VY. Retrospective study of rabies epidemiology in Ukraine (1950–2019). *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*. 2020; 8(1): 36–49.
34. Milligan GN, Barrett ADT, editors. *Vaccinology: An Essential Guide*. Chichester: Wiley Blackwell; 2015. 390 p.
35. World Health Organization. Rabies vaccines: WHO position paper, April 2018 – recommendations. *Vaccine*. 2018; 36(37): 5500–3. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.06.061.
36. Briggs DJ. The role of vaccination in rabies prevention. *Curr Opin Virol*. 2012; 2(3): 309–14. DOI: 10.1016/j.coviro.2012.03.007.
37. Nunnally BK, Turula VE, Sitrin RD, editors. *Vaccine analysis: strategies, principles, and control*. Berlin: Springer; 2015. 665 p. DOI: 10.1007/978-3-662-45024-6.
38. Hurisa B, Mengesha A, Newayesilassie B, Kerga S, Kebede G, Bankovisky D, et al. Production of cell culture based anti-rabies vaccine in Ethiopia. *Procedia in Vaccinology*. 2013; 7: 2–7. DOI: 10.1016/j.provac.2013.06.002.
39. Frazatti-Gallina NM, Paoli RL, Mourão-Fuches RM, Jorge SA, Pereira CA. Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. *J Biotechnol*. 2001; 92(1): 67–72. DOI: 10.1016/s0168-1656(01)00362-5.
40. Sanders B, Koldijk M, Schuitemaker H. Inactivated viral vaccines. In: Nunnally BK, Turula VE, Sitrin RD, editors. *Vaccine analysis: strategies, principles, and control*. Heidelberg: Springer; 2015. P. 45–80.

41. Frazatti-Gallina NM. Purified Vero-cell rabies vaccine. In: Rupprecht C, Nagarajan T, editors. *Current laboratory techniques in rabies diagnosis, research and prevention*. San Diego: Academic Press; 2015. P. 261–8. DOI: 10.1016/B978-0-12-801919-1.00021-X.
42. King AA. Cell culture of rabies virus. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. P. 114–30.
43. Reculard P. Cell-culture vaccines for veterinary use. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. P. 314–23.
44. Singh SN, Rajaram SM. Development and commercialization of cell based viral vaccines for animal health in national immunization in India. *Int J Vaccines Vaccin*. 2016; 3(3): 1–4. DOI: 10.15406/ijvv.2016.03.00066.
45. Consales CA, Valentini JG, Albas A, Mendonca RM, Fuches RM, Soares MA, et al. The preparation of cultured rabies virus and the production of antiserum for human use. *J Biol Stand*. 1988; 16(1): 27–32. DOI: 10.1016/0092-1157(88)90026-1.
46. Lalosević D, Stankov S, Lazarević-Ivanc L, Lalosević V, Knezević I. Immunogenicity of BHK-rabies vaccine in human volunteers. *Med Pregl*. 1998; 51 (Suppl 1): 17–9.
47. Lalosević D, Lalosević V, Lazarević-Ivanc Lj, Knezević I. BHK-21 cell culture rabies vaccine: immunogenicity of a candidate vaccine for humans. *Dev Biol (Basel)*. 2008; 131: 421–9.
48. Astawa INM, Agustini NLP, Tenaya IWM, Aryawiguna IPGW. Protective antibody response of Balb/c mice to Bali rabies virus isolate propagated in BHK-21 cells. *J Vet Med Sci*. 2018; 80(10): 1596–603. DOI: 10.1292/jvms.17-0385.
49. Paldurai A, Singh RP, Gupta PK, Sharma B, Pandey KD. Growth Kinetics of Rabies Virus in BHK-21 Cells using fluorescent activated cell sorter (FACS) analysis and a monoclonal antibody based cell-ELISA. *J Immunol Vaccine Technol*. 2014; 1(1): 1–9.

50. Dacheux L, Bourhy H. Virus isolation in cell culture: the rabies tissue culture infection test. In: Rupprecht C, Nagarajan T, editors. *Current laboratory techniques in rabies diagnosis, research and prevention*. San Diego: Academic Press; 2015. P. 25–31. DOI: 10.1016/B978-0-12-801919-1.00003-8.

51. Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2009; 8(5): 607-618. DOI: 10.1586/erv.09.19.

52. Nicholson KG. Cell culture vaccines for human use: general considerations. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. P. 269–76.

53. Montagnon B, Fanget B. Purified Vero cell vaccine for humans. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. P. 285–96.

54. Trimarchi CV, Rudd RD, Safford JrM. An in vitro virus neutralization test for rabies antibody. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. P. 193–9.

55. Clark HF, Witkor TJ. Temperature-sensitivity characteristics distinguishing substrains of fixed rabies virus: lack of correlation with plaque-size markers or virulence for mice. *J. Infect. Dis.* 1972; 125: 637–46.

56. Seif I, Coulon P, Rollin PE, Flamand A. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J Virol.* 1985; 53(3): 926–34.

57. Zavareh Z. Immunogenicity of BHK-rabies vaccine in cattle. *Iranian Biomed. J.* 2000; 4(4): 129–31.

58. Batista AM, Cruz PS, Almeida E, Costa AEB, Scheffer KC, Chaves LB, et al. Infection of BHK-21 cells cultivated in stationary monolayers by PV and CVS strains. *Boletim Epidemiologico Paulista (BEPA)*, 2009; 6(71): 4–11.

59. Cliquet F, Wasniewski M. The fluorescent antibody virus neutralization test. In: Rupprecht C, Nagarajan T, editors. *Current laboratory techniques in rabies*

diagnosis, research and prevention. San Diego: Academic Press; 2015. P. 217–31. DOI: 10.1016/B978-0-12-801919-1.00018-X.

60. Park JS, Um J, Choi YK, Lee YS, Ju YR, Kim SY. Immunostained plaque assay for detection and titration of rabies virus infectivity. *J Virol Methods*. 2016; 228: 21–5. DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.10.010.

61. Xu H, Hao X, Wang S, Wang Z, Cai M, Jiang J, et al. Real-time imaging of rabies virus entry into living vero cells. *Sci Rep*. 2015; 5: 11753. DOI: 10.1038/srep11753.

62. Smith JS. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. P. 181–9.

63. World Health Organization. Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-sixth report. Geneva: World Health Organization; 2007. (WHO Technical Report Series No. 941). P. 83–132.

64. Gupta CK, Leszczynski J, Gupta RK, Siber GR. Stabilization of respiratory syncytial virus (RSV) against thermal inactivation and freeze-thaw cycles for development and control of RSV vaccines and immune globulin. *Vaccine*. 1996; 14(15): 1417–20. DOI: 10.1016/s0264-410x(96)00096-5.

65. Varyantsia VV, Vysekantsev IP. Storage methods of complex rna viruses. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 27(4): 287–95. DOI: 10.15407/cryo27.04.287.

66. Astrin JJ, Betsou F. Trends in biobanking: a bibliometric overview. *Biopreserv Biobank*. 2016; 14(1): 65–74. DOI: 10.1089/bio.2015.0019.

67. Smith D. Culture collections over the world. *Int Microbiol*. 2003; 6(2): 95–100. DOI: 10.1007/s10123-003-0114-3.

68. Smith D, Ryan MJ. Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. *Scientific World Journal*. 2012; 2012: 1–9. DOI: 10.1100/2012/805659.

69. De Paoli P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiol Rev.* 2005; 29(5): 897–910. DOI: 10.1016/j.femsre.2005.01.005.
70. Smith D, Ryan MJ. The impact of OECD best practice on the validation of cryopreservation techniques for microorganisms. *Cryo Letters.* 2008; 29(1): 63–72.
71. Costa EC, Teixeira MFS, Aguiar TDF, Rolim BN, Romijn PC, Rocha MFG. Rabies virus viability after short-term cryopreservation using cryoprotectant agents. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2011; 70: 106–12.
72. Prakash O, Nimonkar Y, Shouche YS. Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiol Lett.* 2013; 339(1): 1–9. DOI: 10.1111/1574-6968.12034.
73. Cardoso FMC, Petrovajová D, Horňáková T. Viral vaccine stabilizers: status and trends. *Acta Virol.* 2017; 61(3): 231–39. DOI: 10.4149/av_2017_301.
74. Hansen LJJ, Daoussi R, Vervaet C, Remon JP, De Beer TRM. Freeze-drying of live virus vaccines: A review. *Vaccine.* 2015; 33(42): 5507–19. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.08.085.
75. World Health Organization. Temperature sensitivity of vaccines. Geneva: World Health Organization; 2006. 62 p.
76. ATCC. Virology guide. Tips and techniques for propagating virus in tissue culture and embryonated chicken eggs. Manassas: ATCC; 2016. 32 p.
77. Howell CL, Miller MJ. Effect of sucrose phosphate and sorbitol on infectivity of enveloped viruses during storage. *J Clin Microbiol.* 1983; 18(3): 658–62.
78. Tovkach FI, Zhuminska GI, Kushkina AI. Long-term preservation of unstable bacteriophages of enterobacteria. *Mikrobiol Z.* 2012; 74(2): 60–6.
79. Chun BH, Lee YK, Lee BC, Chung N. Development of a varicella virus vaccine stabilizer containing no animal-derived component. *Biotechnol Lett.* 2004; 26(10): 807–12.
80. Uzunova-Doneva T, Donev T. Anabiosis and conservation of microorganisms. *J Cult Collect.* 2005; 4(1): 17–28.

81. Похиленко ВД, Баранов АМ, Детушев КВ. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. Известия ВУЗов. 2009; 4(12): 99–121.
82. Adams GD, Cook I, Ward KR. The principles of freeze-drying. *Methods Mol Biol.* 2015; 1257: 121–43. DOI: 10.1007/978-1-4939-2193-5_4.
83. Tan DT, Poh PE, Chin SK. Microorganism preservation by convective air-drying – A review. *Dry Technol.* 2017; 36(7): 764–79. DOI: 10.1080/07373937.2017.1354876.
84. Alonso S. Novel preservation techniques for microbial cultures. In: Ojha K, Tiwari B, editors. *Novel Food Fermentation Technologies. Food Engineering Series.* Cham: Springer; 2016. Chapter 2; p. 7–33. DOI: 10.1007/978-3-319-42457-6_2.
85. Morris GJ. *Cryopreservation: an introduction to cryopreservation in culture collections.* Cambridge [Cambridgeshire]: Institute of Terrestrial Ecology; 1981. 27 p.
86. Day JG, Harding KC, Nadarajan J, Benson EE. Cryopreservation, conservation of bioresources at ultra low temperatures. In: Walker JM, Rapley R, editors. *Molecular biomethods handbook, 2nd ed.* Totowa: Humana Press; 2008: 917–47.
87. Hosokawa-Muto J, Fujinami Y, Mizuno N. Evaluation of the universal viral transport system for long-term storage of virus specimens for microbial forensics. *J Forensic Leg Med.* 2015; 34: 29–33. DOI: 10.1016/j.jflm.2015.04.019.
88. Rani S, Gogoi P, Kumar S. Spectrum of Newcastle disease virus stability in gradients of temperature and pH. *Biologicals.* 2014; 42(6): 351–4. DOI: 10.1016/j.biologicals.2014.08.006.
89. Rani S, Kumar S. Evaluation of infectious bursal disease virus stability at different conditions of temperature and pH. *Biologicals.* 2015; 43(6): 515–8. DOI: 10.1016/j.biologicals.2015.07.005.
90. Silva AC, Yami M, Libeau G, Carrondo MJ, Alves PM. Testing a new formulation for Peste des Petits Ruminants vaccine in Ethiopia. *Vaccine.* 2014; 32(24): 2878–81. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.02.039.

91. Sviben D, Forčić D, Kurtović T, Halassy B, Brgles M. Stability, biophysical properties and effect of ultracentrifugation and diafiltration on measles virus and mumps virus. *Arch Virol*. 2016; 161(6): 1455–67. DOI: 10.1007/s00705-016-2801-3.
92. Gould EA. Methods for long-term virus preservation. *Mol Biotechnol*. 1999; 13(1): 57–66. DOI: 10.1385/MB:13:1:57.
93. Malenovská H. The influence of stabilizers and rates of freezing on preserving of structurally different animal viruses during lyophilization and subsequent storage. *J Appl Microbiol*. 2014; 117(6): 1810–9. DOI: 10.1111/jam.12654.
94. Liu B, Zhou X. Freeze-drying of proteins. *Methods Mol Biol*. 2015; 1257: 459–76. DOI: 10.1007/978-1-4939-2193-5_23.
95. Pastorino B, Baronti C, Gould EA, Charrel RN, de Lamballerie X. Effect of chemical stabilizers on the thermostability and infectivity of a representative panel of freeze dried viruses. *PLoS One*. 2015; 10(4): e0118963. DOI: 10.1371/journal.pone.0118963.
96. Aguiar TD, Teixeira MF, Costa EC, Vitaliano AB, Teles CH, Barroso IC, et al. Medium-term cryopreservation of rabies virus samples. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013; 46(6): 678–83. DOI: 10.1590/0037-8682-0135-2013.
97. Witt DJ, Bousquet EB. Cryogenic preservation of virus-infected cells used as immunofluorescent assay substrates. *J Virol Methods*. 1987; 17(3-4): 287–92. DOI: 10.1016/0166-0934(87)90138-8.
98. Gallo D, Kimpton JS, Johnson PJ. Isolation of human immunodeficiency virus from peripheral blood lymphocytes stored in various transport media and frozen at –60°C. *J Clin Microbiol*. 1989; 27(1): 88–90.
99. Tedeschi R, De Paoli P. Collection and preservation of frozen microorganisms. *Methods Mol Biol*. 2011; 675: 313–26. DOI: 10.1007/978-1-59745-423-0_18
100. Jorio H, Tran R, Kamen A. Stability of serum-free and purified baculovirus stocks under various storage conditions. *Biotechnol Prog*. 2006; 22(1): 319–25. DOI: 10.1021/bp050218v.

101. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003; 46(3): 205–29.
102. Tlaxca JL, Ellis S, Remmele RL Jr. Live attenuated and inactivated viral vaccine formulation and nasal delivery: potential and challenges. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015; 93: 56–78. DOI: 10.1016/j.addr.2014.10.002.
103. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*. 2015; 1257: 3–19. DOI: 10.1007/978-1-4939-2193-5_1.
104. Keros V, Fuller BJ. Cryopreservation of mammalian oocytes. *Methods Mol Biol*. 2015; 1257: 289–304. DOI: 10.1007/978-1-4939-2193-5_11.
105. Johnson FB. Transport of viral specimens. *Clin Microbiol Rev*. 1990; 3(2): 120–31. DOI: 10.1128/cmr.3.2.120
106. Croyle MA, Cheng X, Wilson JM. Development of formulations that enhance physical stability of viral vectors for gene therapy. *Gene Ther*. 2001; 8(17): 1281–90. DOI: 10.1038/sj.gt.3301527.
107. Lin SY, Chung YC, Chiu HY, Chi WK, Chiang BL, Hu YC. Evaluation of the stability of enterovirus 71 virus-like particle. *J Biosci Bioeng*. 2014; 117(3): 366–71. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.08.015.
108. Wang N, Zhang Y, Lei X, Yu W, Zhan Y, Wang D, et al. Optimized conditions for preserving stability and integrity of porcine circovirus type2 virus-like particles during long-term storage. *J Virol Methods*. 2017; 243: 146–50. DOI: 10.1016/j.jviromet.2017.01.021.
109. Patel AC, Upmanyu V, Ramasamy S, Gupta PK, Singh R, Singh RP. Molecular and immunogenic characterization of BHK-21 cell line adapted CVS-11 strain of rabies virus and future prospect in vaccination strategy. *Virusdisease*. 2015; 26(4): 288–96.
110. Yager ML, Moore SM. The rapid fluorescent focus inhibition test. In: Rupprecht C, Nagarajan T, editors. *Current laboratory techniques in rabies diagnosis, research and prevention*. San Diego: Academic Press; 2015. P. 199–215. DOI: 10.1016/B978-0-12-801919-1.00017-8.

111. Львов ДК, редактор. Медицинская вирусология. М.: МИА; 2008. 655 с.
112. Kornienko LE, Moroz OA, Mezhensky AO, Skorokhod, SV, Datsenko RA, Karpulenko MS, et al. Epizootological and epidemiological aspects for rabies in Ukraine for the period from 1999 to 2018. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*. 2019; (3): 90–109.
113. Олексенко ОВ. Исторична ретроспектива і перспектива рабічної інфекції в Україні. *Інфекційні хвороби*. 2019; (4): 48–52.
114. Aguilar-Setién A, Aguila-Tecuatl H, Tesoro-Cruz E, Ramos-Ramírez L, Kretschmer RS. Preservation of rabies virus RNA from brain tissue using glycerine. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003; 97(5): 547–9. DOI: 10.1016/s0035-9203(03)80021-4.
115. Gelderblom HR. Structure and classification of viruses. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology* [Internet]. 4th ed. Galveston: The University of Texas Medical Branch; 1996. Chapter 41, Section 2 Virology. [cited 2019 Jun 26] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8174/>
116. Amarasinghe GK, Aréchiga Ceballos NG, Banyard AC, Basler CF, Bavari S, Bennett AJ et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2018. *Arch Virol*. 2018; 163(8): 2283-2294. DOI: 10.1007/s00705-018-3814-x.
117. Dietzgen RG, Kondo H, Goodin MM, Kurath G, Vasilakis N. The family Rhabdoviridae: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins. *Virus Res*. 2017; 227: 158–170. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.10.010.
118. Walker PJ, Blasdell KR, Calisher CH, Dietzgen RG, Kondo H, Kurath G, et al. ICTV virus taxonomy profile: Rhabdoviridae. *J Gen Virol*. 2018; 99(4): 447–8. DOI: 10.1099/jgv.0.001020.
119. Meslin FX, Kaplan MM. An overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and in rabies research. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. P. 9–27.

120. Dean DJ. The fluorescent antibody test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. P. 88–95.

121. Duong V, Tarantola A, Ong S, Mey C, Bourhy H, Dussart P, et al. Laboratory diagnostics in dog-mediated rabie: an overview of performance and a proposed strategy in various settings. *Int. J. Infect. Dis.* 2016; 46: 107–14. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.03.016.

122. Smith TG, Wu X, Franka R, Rupprecht CE. Design of future rabies biologics and antiviral drugs. In: Jackson A, editor. *Advances in Virus Research*, Vol. 79. Burlington: Academic Press; 2011. P. 345–363. DOI: 10.1016/B978-0-12-387040-7.00016-0.

123. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика». Київ: Міністерство Охорони Здоров'я; 2020. 338 с.

124. Lombardo T, Dotti S, Villa R, Cinotti S, Ferrari M. Veterinary biobank facility: development and management for diagnostic and research purposes. *Methods Mol Biol.* 2015; 1247: 43–60. DOI: 10.1007/978-1-4939-2004-4_4.

125. Romette JL, Prat CM, Gould EA, de Lamballerie X, Charrel R, Coutard B, et al. The European Virus Archive goes global: A growing resource for research. *Antiviral Res.* 2018; 158: 127–34. DOI: 10.1016/j.antiviral.2018.07.017.

126. Ma Y, Chen H, Lei R, Ren J. Biobanking for human microbiome research: promise, risks, and ethics. *ABR.* 2017; 9(4): 311–324. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41649-017-0033-9>.

127. Parashar A. International depository authority and its role in microorganism's deposition. *J Clin Diagn Res.* 2017; 11(8): DE01–DE06. DOI: 10.7860/JCDR/2017/29077.10408.

128. Lajaunie C, Ho CW. Pathogens collections, biobanks and related-data in a One Health legal and ethical perspective. *Parasitology.* 2018; 145(5): 688–96. DOI: 10.1017/S0031182017001986.

129. Ridpath JF, Neill JD, Chiang YW, Waldbillig J. Stability of Bovine viral diarrhea virus 1 nucleic acid in fetal bovine samples stored under different conditions. *J Vet Diagn Invest.* 2014; 26(1): 6–9. DOI: 10.1177/1040638713512315.

130. Olson MR, Axler RP, Hicks RE. Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *J Virol Methods.* 2004; 122(2): 147–52. DOI: 10.1016/j.jviromet.2004.08.010.

131. Максимов НА. О вымерзании и холодостойкости растений. *Изв. Лесного ин-та.* 1913; 25: 330.

132. Максимов НА. Растения и низкие температуры. *Тр. по с.-х. метеорологии.* 1914; 13: 8–35.

133. Lovelock JE. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta.* 1953; 10(3): 414–26. DOI: 10.1016/0006-3002(53)90273-x.

134. Meryman HT. The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury. In: Wolstenholme GEW, O'Connor M, editors. *The frozen cell. A CIBA Foundation Symposium.* London: Churchill Press; 1970. P. 51–64.

135. Meryman HT. Freezing injury and its prevention in living cells. *Annu Rev Biophys Bioeng.* 1974; 3(0): 341–63. DOI: 10.1146/annurev.bb.03.060174.002013.

136. Meryman HT, Williams RJ, Douglas MSJ. Freezing injury from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology.* 1977; 14(3): 287–302. DOI: 10.1016/0011-2240(77)90177-8.

137. Quinn PJ. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology.* 1985; 22(2): 128–46. DOI: 10.1016/0011-2240(85)90167-1.

138. Белоус АМ, Грищенко ВИ. *Криобиология.* Киев: Наукова думка; 1994. 432 с.

139. Гордиенко ЕА, Пушкарь НС. *Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.* К.: Наукова думка; 1994. 144 с.

140. Зинченко АВ, Грищенко ВИ, Моисеев ВА. О диэлектрическом пробое мембран при криоконсервировании биологических объектов. Доклады АН СССР. 1989; 308(1): 215–7.
141. Levitt J. A sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistance in plants. *Journal of Theoretical Biology*. 1962; 3(3): 355–91.
142. Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med*. 2002; 20(1): 5–13. DOI: 10.1055/s-2002-23515.
143. Mazur P. *Cryobiology: The Freezing of Biological Systems*. Science. 1970; 168(3934): 939–49. DOI: 10.1126/science.168.3934.939.
144. Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. evidence from chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res*. 1972; 71(2): 345–55. DOI: 10.1016/0014-4827(72)90303-5.
145. Mazur P. Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications. *Am J Physiol*. 1984; 247(3 Pt 1): C125–42. DOI: 10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125.
146. Лозина-Лозинский ЛК. Мультифакторная теория криоповреждений. *Криобиология и криомедицина*. 1980; 7: 3–6.
147. Pribor DB. Biological interactions between cell membranes and glycerol or DMSO. *Cryobiology*. 1975; 12: 309–20.
148. White JA, Estrada M, Flood EA, Mahmood K, Dhere R, Chen D. Development of a stable liquid formulation of live attenuated influenza vaccine. *Vaccine*. 2016; 34(32): 3676–83. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.04.074.
149. Sokhey J, Gupta CK, Sharma B, Singh H. Stability of oral polio vaccine at different temperatures. *Vaccine*. 1988; 6(1): 12–3. DOI: 10.1016/0264-410x(88)90006-0.
150. Johne R, Trojnar E, Filter M, Hofmann J. Thermal stability of hepatitis E virus as estimated by a cell culture method. *Appl Environ Microbiol*. 2016; 82(14): 4225–31. DOI: 10.1128/AEM.00951-16.
151. Blaho JA, Morton ER, Yedowitz JC. Herpes simplex virus: propagation, quantification, and storage. In: Coico R, editor. *Current protocols in microbiology*. New

York: John Wiley & Sons, Inc.; 2005. Chapter 14; p. 14E.1.1–14E.1.23. DOI: 10.1002/9780471729259.mc14e01s00.

152. Szretter KJ, Balish AL, Katz JM. Influenza: propagation, quantification, and storage. In: Coico R, editor. *Current protocols in microbiology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2006. Chapter 15; p. 15G.1.1–15G.1.22. DOI: 10.1002/0471729256.mc15g01s3.

153. Delgadillo-Gutiérrez K, Ribas-Aparicio RM, Jiménez-Alberto A, Aparicio-Ozores G, Castelán-Vega JA. Stability of retroviral pseudotypes carrying the hemagglutinin of avian influenza viruses under various storage conditions. *J Virol Methods*. 2019; 263: 44–9. DOI: 10.1016/j.jviromet.2018.10.013.

154. Gotoh T, Ando N, Kikuchi K. Analysis of inactivation of AcMNPV under various conditions by the ELVA method. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008; 72(7): 1973–6. DOI: 10.1271/bbb.80105.

155. Chaniot SCM, Holmes MJ, Stott EJ, Tyrrell DAJ. An investigation of media for the long term storage of three respiratory viruses. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1974; 44(4): 396–400. DOI: 10.1007/BF01251022.

156. Стегній МЮ. Тривале зберігання вірусів за низьких температур у біотехнології виробництва імунобіологічних препаратів. *Ветеринарна медицина*. 2011; (95): 80–3.

157. Цуцаева АА, Высеканцев ИП, Микулинский ЮЕ, Бутенко АЕ. Влияние низких температур на выживаемость и внутриклеточное размножение бактериофагов *E. coli*. *Микробиология*. 1981; 50(2): 292–4.

158. Цуцаева АА, Высеканцев ИП, Исерович ПГ, Бронштейн ВЛ, Иткин ЮА. Влияние режимов замораживания на выживаемость бактериофагов *E. coli*. *Микробиология*. 1982; 51(4): 632–5.

159. Высеканцев ИП, Бутенко АЕ. Изучение свойств кишечных бактериофагов после низкотемпературного консервирования. *Криобиология и криомедицина*. 1982; 10: 43–6.

160. Gonzalez-Menendez E, Fernandez L, Gutierrez D, Rodriguez A, Martinez B, Garcia P. Comparative analysis of different preservation techniques for the

storage of Staphylococcus phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products. *PLoS One*. 2018; 13(10): e0205728. DOI: 10.1371/journal.pone.0205728. eCollection 2018.

161. Wallis C, Melnick JL. Stabilization of enveloped viruses by dimethyl sulfoxide. *J Virol*. 1968; 2(9): 953–4.

162. Croyle MA, Roessler BJ, Davidson BL, Hilfinger JM, Amidon GL. Factors that influence stability of recombinant adenoviral preparations for human gene therapy. *Pharm Dev Technol*. 1998; 3(3): 373–83. DOI: 10.3109/10837459809009865.

163. Sutherland TD, Sriskantha A, Church JS, Strive T, Trueman HE, Kameda T. Stabilization of viruses by encapsulation in silk proteins. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014; 6(20): 18189–96. DOI: 10.1021/am5051873.

164. Grosz DD, van Geelen A, Gallup JM, Hostetter SJ, Derscheid RJ, Ackermann MR. Sucrose stabilization of Respiratory Syncytial Virus (RSV) during nebulization and experimental infection. *BMC Res Notes*. 2014; 7(1): 1–9. DOI: 10.1186/1756-0500-7-158.

165. Ash RJ, Barnhart ER. Optimal cooling and warming rates in the preservation of herpes simplex virus (type 2). *J Clin Microbiol*. 1975; 2(3): 270–1.

166. Tannock GA, Hierholzer JC, Bryce DA, Chee CF, Paul JA. Freeze-drying of respiratory syncytial viruses for transportation and storage. *J Clin Microbiol*. 1987; 25(9): 1769–71.

167. Hernandez R, Sinodis C, Brown DT. Sindbis virus: propagation, quantification, and storage. In: Coico R, editor. *Current protocols in microbiology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2005. Chapter 15; p. 15B.1.1–15B.1.34. DOI: 10.1002/9780471729259.mc15b01s00.

168. Precausta PM, Simatos D, Le Pemp M, Devaux B, Kato F. Influence of residual moisture and sealing atmosphere on viability of two freeze-dried viral vaccines. *J Clin Microbiol*. 1980; 12(4): 483–9.

169. Dubrovina IA, Kiseleva IV, Kireeva EV, Rudenko LG. Composition of the stabilizer and conditions of lyophilization for preserving infectious activity of influenza virus. *Bull Exp Biol Med*. 2018; 165(1): 52–6. DOI: 10.1007/s10517-018-4097-7.

170. Adebayo AA, Sim-Brandenburg JW, Emmel H, Olaleye DO, Niedrig M. Stability of 17D yellow fever virus vaccine using different stabilizers. *Biologicals*. 1998; 26(4): 309–16. DOI: 10.1006/biol.1998.0157
171. Поздеев ОК, Покровский ВИ, редакторы. Медицинская микробиология. М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА; 1998. 1200 с.
172. Celma CC, Stewart M, Wernike K, Eschbaumer M, Gonzalez-Molleda L, Breard E, et al. Replication-deficient particles: new insights into the next generation of bluetongue virus vaccines. *J Virol*. 2017; 91(1): 1–16. DOI: 10.1128/JVI.01892-16.
173. Fishaut M, Murphy N, Yanagihara R, McIntosh K. Cryopreservation of virus-infected cells for use in the fluorescent antibody to membrane antigen test. *J Clin Microbiol*. 1980; 11(6): 687–90.
174. Kamali Jamil R, Shayestehour M, Sadigh ZA, Taqavian M, Shahkarami MK, Esna-Ashari F, et al. The Effect of Various Stabilizers on Preserving Immunogenicity of Lyophilized Mumps Vaccines. *J Res Health Sci*. 2017; 17(4): e00393.
175. Siddiqui MSI, Giasuddin M, Chowdhury SMZH, Islam MR, Chowdhury EH. Comparative effectiveness of dimethyl sulphoxide (DMSO) and glycerol as cryoprotective agent in preserving Vero cells. *Bangl. Veterin*. 2015; 32(2): 35–41.
176. Greiff D, Rightsel WA. Stabilities of suspensions of viruses after freezing or drying by vacuum sublimation and storage. *Cryobiology*. 1967; 3(6): 432–44. DOI: 10.1016/s0011-2240(67)80153-6.
177. McGinnes LW, Pantua H, Reitter J, Morrison TG. Newcastle disease virus: propagation, quantification, and storage. In: Coico R, editor. *Current protocols in microbiology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2006. Chapter 15; p. 15F.2.1–15F.2.18. DOI: 10.1002/9780471729259.mc15f02s01.
178. Draget KI, Østgaard K, Smidsrød O. Homogeneous alginate gels: A technical approach. *Carbohydr. Polym*. 1990; 14(2): 159–78. DOI: 10.1016/0144-8617(90)90028-Q.

179. Simó G, Fernández-Fernández E, Vila-Crespo J, Ruipérez V, Rodríguez-Nogales JM. Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation. *Carbohydr Polym.* 2017; 170: 1–14. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.04.013.
180. Mahler S, Desille M, Frémond B, Chesné C, Guillouzo A, Campion JP, et al. Hypothermic storage and cryopreservation of hepatocytes: the protective effect of alginate gel against cell damages. *Cell Transplant.* 2003; 12(6): 579–92. DOI: 10.3727/000000003108747181.
181. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci.* 2012; 37(1): 106–26. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003
182. Merino O, Figueroa E, Cheuquemán C, Valdebenito I, Isachenko V, Isachenko E, et al. Short-term storage of salmonids semen in a sodium alginate-based extender. *Andrologia.* 2017; 49(5): 1–5. DOI: 10.1111/and.12661.
183. Szekalska M, Puciłowska A, Szymańska E, Ciosek P, Winnicka K. Alginate: current use and future perspectives in pharmaceutical and biomedical applications. *Int J Polym Sci.* 2016; 1–17. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7697031>.
184. Liu G, Li S, Yuan H, Hao M, Wurihan, Yun Z, et al. Effect of sodium alginate on mouse ovary vitrification. *Theriogenology.* 2018; 113: 78–4. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.02.006.
185. Tanaka T, Takeda T, Miyajama R. Cryoprotective effect of saccharides on denaturation of catalase during freeze-drying. *Chem. Pharm. Bull.* 1991; 675(5): 1091–4.
186. Fahy GM. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology.* 1986; 23(1): 1–13.
187. Chian RC. Cryobiology: an overview. In: Chian RC, Quinn P, editors. *Fertility Cryopreservation*. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. Chapter 1; p. 1–9.
188. Zhang XC, Liu S, Hou GY, Zhuang QY, Wang KC, Jiang WM, et al. Comparison of three media for transport and storage of the samples collected for

detection of avian influenza virus. *J Virol Methods*. 2015; 222: 202–5. DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.07.001.

189. Green M, Loewenstein PM. Human adenoviruses: propagation, purification, quantification, and storage. In: Coico R, editor. *Current protocols in microbiology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2005. Chapter 14; p. 14C.1.1–14C.1.19. DOI: 10.1002/9780471729259.mc14c01s00.

190. Silva AC, Carrondo MJ, Alves PM. Strategies for improved stability of Peste des Petits Ruminants Vaccine. *Vaccine*. 2011;29(31):4983–91. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.04.102.

191. Bean B, Moore BM, Sterner B, Peterson LR, Gerding DN, Balfour Jr HH. Survival of influenza viruses on environmental surfaces. *J Infect Dis*. 1982; 146(1): 47–51. DOI: 10.1093/infdis/146.1.47.

192. Asim M, Rashid A, Chaudhary AH. Effect of various stabilizers on titre of lyophilized live-attenuated Peste des petits ruminants (PPR) vaccine. *Pakistan Vet. J*. 2008; 28(4): 203–4.

193. Latif MZ, Khushi M, Riaz H, Faisal S, Imran A, Muhammad A, et al. Effect of Stabilizers on Infectivity Titer of Freeze Dried Peste Des Petits Ruminants Virus Vaccine. *Pakistan Vet. J*. 2018; 38(2): 169–73.

194. Кокорина ЕГ, Элизбарашвили ЭИ. Изучение эффективности защитных сред для высушивания и хранения вируса инфекционного ринотрахеита кошек. *Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии*. 2013; (2): 58–9.

195. Kang MS, Jang H, Kim MC, Kim MJ, Joh SJ, Kwon JH, et al. Development of a stabilizer for lyophilization of an attenuated duck viral hepatitis vaccine. *Poult Sci*. 2010; 89(6): 1167–70. DOI: 10.3382/ps.2009-00620.

196. Груздев ЛК, Уласов ВИ, Груздев КН. Оценка эффективности стабилизирующих сред при изготовлении стандартного образца штамма CVS фиксированного вируса бешенства. *Ветеринарная патология*. 2007; (4): 32–7.

197. Полупан ІМ. Оцінка різних методів зберігання вакцинних штамів вірусу сказу. *Ветеринарна біотехнологія*. 2011; (20): 127–33.

198. Mather ST, Wright E., Scott SD, Temperton NJ. Lyophilisation of influenza, rabies and Marburg lentiviral pseudotype viruses for the development and distribution of a neutralisation -assay-based diagnostic kit. *J Virol Methods*. 2014; 210: 51–8. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.09.021.

199. Coico R, Lunn G. Biosafety: guidelines for working with pathogenic and infectious microorganisms. In: Coico R, editor. *Current protocols in microbiology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2005. Chapter 1; p. 1A.1.1–1A.1.8. DOI: 10.1002/9780471729259.mc01a01s00.

200. Aubert MFA. Methods for the calculation of titers. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. P. 445–59.

201. Kuehne RW. Rapid determination of log₁₀ 50% lethal doses or 50% infective doses. *J Clin Microbiol*. 1983; 17: 702–3.

202. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol*. 2016; 5(2): 85–6. DOI: 10.5501/wjv.v5.i2.85.

203. Morimoto K, Hooper DC, Carbaugh H, Fu ZF, Koprowski H, Dietzschold B. Rabies virus quasispecies: implications for pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(6): 3152–6. DOI: 10.1073/pnas.95.6.3152.

204. Shiraishi R, Nishimura M, Nakashima R, Enta C, Hirayama N. Neutralizing antibody response in dogs and cats inoculated with commercial inactivated rabies vaccines. *J Vet Med Sci*. 2014; 76(4): 605–9. DOI: 10.1292/jvms.13-0335.

205. Witte R, Andriasyan V, Georgi F, Yakimovich A, Greber UF. Concepts in light microscopy of viruses. *Viruses*. 2018; 10(4): 202. DOI: 10.3390/v10040202.

206. Рокицкий ПФ. Биологическая статистика. Мінськ: Висша школа; 1973. 320 с.

207. Атраментова ЛА, Утевская ОМ. Статистические методы в биологии. Горловка: ЧП «Видавництво ліхтар»; 2008. 248 с.

208. StatSoft. *Statistica: обзор методов анализа и руководство пользователя*. StatSoft; 2001. 222 с.

209. Nunes CA, Alvarenga VO, de Souza Sant'Ana A, Santos JS, Granato D. The use of statistical software in food science and technology: Advantages, limitations and misuses. *Food Res Int.* 2015; 75: 270–80. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.06.011.
210. Hess AS, Hess JR. Analysis of variance. *Transfusion.* 2018; 58(10): 2255–6. DOI: 10.1111/trf.14790.
211. Henson RN. Analysis of variance (ANOVA). In: Toga AW, editor. *Brain Mapping: an encyclopedic reference*, vol. 1. Academic Press: Elsevier; 2015. P. 477–81.
212. Oliver-Rodríguez JC, Wang XT. Non-parametric three-way mixed ANOVA with aligned rank tests. *Br J Math Stat Psychol.* 2015; 68(1): 23–42. DOI: 10.1111/bmsp.12031.
213. Van Ginkel JR, Kroonenberg PM. Analysis of variance of multiply imputed data. *Multivariate Behav Res.* 2014; 49(1): 78–91. DOI: 10.1080/00273171.2013.855890.
214. Буркова ВВ, Лаврик ОА. Інфекційна активність промислових штамів вірусу сказу після зберігання при різних низьких температурах. В: Збірник тез VIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського «Молодь і поступ біології»; 2013 Квіт. 16–19; Львів. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка; 2013. с. 279–80.
215. Burkova VV, Pishko OV. Infectious Activity of industrial strains of rabies virus after storage at $-20, -80^{\circ}\text{C}$. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2014; 24(2): 175.
216. Burkova VV, Vysekantsev IP, Lavrik AA. Preservation of infectious activity of rabies virus industrial strains stored at various temperatures. *Electronic periodical publication of SFU «Live and bioconcent systems».* 2014; 9: 1–11.
217. Буркова ВВ, Лаврик АА, Мороз ОЕ, Великий ИС. Вирулентность контрольного штамма вируса бешенства CVS (20%-мозговая суспензия) в зависимости от температуры хранения. В: Сборник тезисов 19-ой Международной Пуцинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века»; 2015 Апр. 20–24; Пушино. Пушино:

Межфакультетский научно-образовательный центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; 2015. с. 164–5.

218. Burkova VV, Lavrik AA. Activity of rabies virus strain CVS (20% cerebral suspension) after storage at different temperatures. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2015; 25(2): 170.

219. Burkova VV, Lavrik AA, Vysekantsev IP. Infectious activity of attenuated rabies virus strains L. Pasteur and CVS after low temperature storage. In: Abstract book of the First International conference of young scientists 2015 (CYS-2015); 2015 Sep. 21–25; Kyiv. Lutsk: Vezha-Print; 2015. p. 113.

220. Burkova VV. Storage of rabies virus strains L. Pasteur and CVS at low temperatures using cryoprotectants. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2016; 26(2): 162. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo26.02.162>

221. Varianytsia VV, Vysekantsev IP. Long-term storage of rabies virus fixed strains L. Pasteur and CVS at temperatures of -20 and -80°C using protective media. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2018; 28(2): 169. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo28.02.169>

222. Стрилець ОП, Щетинина МВ, Варяниця ВВ. Время инактивации вируса бешенства при получении антирабических вакцин. В: Збірник наукових праць VII Науково-практичної дистанційної конференції з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології», 2018 Лист. 23; Харків. Харків: Вид-во НФаУ; 2018. с. 368–70.

223. Варяниця ВВ, Новікова ОЮ. Порівняння методів RFFIT та MNT при контролі титрів антирабічних антитіл в препараті антирабічного імуноглобуліну. В: Proceedings of the 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation; 2019 June 18–21; Yaremche, Ukraine. Львів. С. 58.

224. Варяниця ВВ, Высеканцев ИП. Применение защитных сред для долгосрочного хранения фиксированного штамма вируса бешенства L. Pasteur при низких температурах. В: Збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції «Медична наука та практика: виклики і

сьогодення»; 2019 Серп. 23–24; Львів. Львів: ГО «Львівська медична спільнота»; 2019. с. 87–90.

225. Варяница ВВ, Высеканцев ИП. Защитные среды для хранения стандартного штамма вируса бешенства CVS при температурах –20, –80°C. Вестник проблем биологии и медицины. 2019; 4(1): 205–11. DOI: <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2019-4-1-153-205-211>

226. Varianytsia VV, Vysekantsev IP. Protective media for storage of L. Pasteur rabies virus strain at different temperatures. IOSR Journal Of Pharmacy. 2019; 9(1): 9–18.

227. Новікова ОЮ, Варяница ВВ, винахідники; патентовласник ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК». Спосіб кількісного визначення антирабічного антигену *in vitro* в інактивованих антирабічних вакцинах. Патент України на корисну модель №118343. Публ. 10.08.2017. Бюл. № 15.

228. Сергеев ГБ, Батюк ВА. Криохимия. Москва: Химия; 1978. 296 с.

229. Leibo SP, Mazur P. The role of cooling rates in low-temperature preservation. Cryobiology. 1971; 8(5): 447–52.

230. Mazur P. Causes of injury in frozen and thawed cells. Fed Proc. 1965; 24(1): 175–82.

231. Yermolenko NA, Savonova MS, Varianytsia VV, Kalyuzhnaya OS. Method of producing a suspension of rabies virus strain L. Pasteur for the production of the rabies vaccine. In: Abstract book of the XXIV International scientific and practical conference of young scientists and students “Topical issues of new drugs development”; 2017 Apr. 20; Kharkiv. Kharkiv: NUPh; 2017. p. 349–50.

232. Varianytsia VV, Vysekantsev IP. Storage of standard fixed rabies virus CVS strain in protective media with sucrose, glycerol and maltose at different temperatures during one year. Probl Cryobiol Cryomed. 2019; 29(2): 153. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo29.02.153>

233. Varianytsia VV, Vysekantsev IP. Influence of protective media composition and storage temperatures on preservation of rabies virus vaccine strain

- L. Pasteur. IOSR Journal Of Pharmacy And Biological Sciences. 2020; 15(3): 20–9. DOI: <https://doi.org/10.9790/3008-1503012029>
234. Varianytsia VV, Vysekantsev IP. Impact of storage temperature regimens and protective media composition on rabies virus CVS strain preservation. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2020. 30(2): 148–57. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo30.02.148>
235. Varianytsia VV, Vysekantsev IP. Effectiveness of protective media applying for long-term storage of the rabies virus L. Pasteur strain at various low temperatures. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2020; 30(3): 283. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo30.03.283>
236. Нардид ОА. Влияние низких температур на белковые системы. *Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2014; 24(2): 83–101.
237. Жмакин АИ. Физические основы криобиологии. *Успехи физических наук*. 2008; 178(3): 243–66.
238. Чиргадзе ЮН, Овсян АМ. Роль воды в подвижности пептидных структур. Изучение конформационных переходов при гидратации. *Биофизика*. 1972; 17(4): 569–74.
239. Аскоченская НА, Аксенов СИ. Структура воды и ее роль в биологических системах. *Успехи совр. биологии*. 1972; 73(2): 288–306.
240. Hey MJ, Cdongh JM. Ion effects on macromolecules in aqueous solution. *Nature*. 1976; 262(5571): 807–9.
241. Ruegg M, Moor V, Blance B. Hydration and thermal denaturation of γ -lactoglobulin: a calorimetric study. *Biochem. Biophys. Acta*. 1975; 400(2): 334–42.
242. Хургин ЮИ, Шерман ФБ, Тусупкалиев УП. Изотермы гидратации глобулярных белков в динамическом режиме. *Биохимия*. 1977; 42(3): 490–97.
243. Cao E, Chen Y, Cui Z, Forster PR. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnol. Bioenerg*. 2003; 82(6): 684–90.
244. Fink AL. Cryoenzymology: The use of sub-zero temperatures and fluid solutions in study of enzyme mechanisme. *J. Theor. Biol*. 1976; 61(3): 419–45.

245. Шатабаева ЭО, Мун ГА, Шайхутдинов ЕМ, Хуторянский ВВ. Желатин: источники, получение и применение в пищевой промышленности и биомедицине. Вестник КазНУ. Серия химическая. 2020; (3): 28–46.

246. Varianytsia VV, Vysekantsev IP. Freeze-drying and subsequent storage of fixed L. Pasteur strain rabies virus. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 27(2): 162. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo27.02.162>

247. Varianytsia VV, Vysekantsev IP. Preservation of lyophilized rabies virus strain L. Pasteur after storage at temperatures of 5, –20 and –80°C. In: Abstract book of 2nd International conference “Smart Bio”; 2018 May 03–05; Kaunas, Lithuania. Kaunas: Vytautas Magnus University; 2018. p. 352.

248. Varianytsia VV, Vysekantsev IP. Infectious activity of L. Pasteur rabies virus vaccine strain frozen-dried in various protective media and then stored at various temperatures. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018; 28(4): 333–42. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo28.04.333>

249. Жегунов ГФ, Нардид ОА, редакторы. Основы криобиологии и криомедицины: учебник для студентов-биологов и медиков. Харьков. 2019. 616 с.

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача за темою дисертації та відомості про апробацію
результатів дисертаціїНаукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертаціїСтатті у фахових виданнях України

1. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Infectious activity of L. Pasteur rabies virus vaccine strain frozen-dried in various protective media and then stored at various temperatures. Probl Cryobiol Cryomed. 2018; 28(4): 333–42. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo28.04.333> (Scopus).

2. **Варяница ВВ**, Высеканцев ИП. Защитные среды для хранения стандартного штамма вируса бешенства CVS при температурах –20, –80°C. Вестник проблем биологии и медицины. 2019; 4(1): 205–11. DOI: <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2019-4-1-153-205-211>.

3. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Impact of storage temperature regimens and protective media composition on rabies virus CVS strain preservation. Probl Cryobiol Cryomed. 2020. 30(2): 148–57. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo30.02.148> (Scopus).

Статті в наукових періодичних виданнях інших країн

4. **Burkova VV**, Vysekantsev IP, Lavrik AA. Preservation of infectious activity of rabies virus industrial strains stored at various temperatures. Electronic periodical publication of SFU «Live and bioconcent systems». 2014; 9: 1–11.

5. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Protective media for storage of L. Pasteur rabies virus strain at different temperatures. IOSR Journal Of Pharmacy. 2019; 9(1): 9–18.

6. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Influence of protective media composition and storage temperatures on preservation of rabies virus vaccine strain L. Pasteur. IOSR Journal Of Pharmacy And Biological Sciences. 2020; 15(3): 20–9. DOI: <https://doi.org/10.9790/3008-1503012029>.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

Оглядові статті в журналах, які входять до міжнародних наукометричних баз

7. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Storage methods of complex RNA viruses. Probl Cryobiol Cryomed. 2017; 27(4): 287–95. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo27.04.287> (Scopus).

Тези наукових доповідей конференцій

8. **Буркова ВВ**, Лаврік ОА. Інфекційна активність промислових штамів вірусу сказу після зберігання при різних низьких температурах. В: Збірник тез VIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського «Молодь і поступ біології»; 2013 Квіт. 16–19; Львів. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка; 2013. с. 279–80.

9. **Burkova VV**, Pishko OV. Infectious activity of industrial strains of rabies virus after storage at –20, –80°C. Probl Cryobiol Cryomed. 2014; 24(2): 175.

10. **Буркова ВВ**, Лаврик АА, Мороз ОЕ, Великий ІС. Вирулентность контрольного штамма вируса бешенства CVS (20%-мозговая суспензия) в зависимости от температуры хранения. В: Сборник тезисов 19-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века»; 2015 Апр. 20–24; Пущино. Пущино: Межфакультетский научно-образовательный центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; 2015. с. 164–5.

11. **Burkova VV**, Lavrik AA. Activity of rabies virus strain CVS (20% cerebral suspension) after storage at different temperatures. Probl Cryobiol Cryomed. 2015; 25(2): 170.

12. **Burkova VV**, Lavrik AA, Vysekantsev IP. Infectious activity of attenuated rabies virus strains L. Pasteur and CVS after low temperature storage. In: Abstract book of the 1st International conference of young scientists 2015 (CYS-2015); 2015 Sep. 21–25; Kyiv. Lutsk: Vezha-Print; 2015. p. 113.

13. **Burkova VV**. Storage of rabies virus strains L. Pasteur and CVS at low temperatures using cryoprotectants. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2016; 26(2): 162. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo26.02.162>.

14. Yermolenko NA, Savonova MS, **Varianytsia VV**, Kalyuzhnaya OS. Method of producing a suspension of rabies virus strain L. Pasteur for the production of the rabies vaccine. In: Abstract book of the XXIV International scientific and practical conference of young scientists and students “Topical issues of new drugs development”; 2017 Apr. 20; Kharkiv. Kharkiv: NUPh; 2017. p. 349–50.

15. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Freeze-drying and subsequent storage of fixed L. Pasteur strain rabies virus. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 27(2): 162. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo27.02.162>.

16. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Preservation of lyophilized rabies virus strain L. Pasteur after storage at temperatures of 5, –20 and –80°C. In: Abstract book of 2nd International conference “Smart Bio”; 2018 May 03–05; Kaunas, Lithuania. Kaunas: Vytautas Magnus University; 2018. p. 352.

17. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Long-term storage of rabies virus fixed strains L. Pasteur and CVS at temperatures of –20 and –80°C using protective media. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018; 28(2): 169. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo28.02.169>.

18. Стрилец ОП, Щетинина МВ, **Варяниця ВВ**. Время инактивации вируса бешенства при получении антирабических вакцин. В: Збірник наукових праць VII Науково-практичної дистанційної конференції з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології», 2018 Лист. 23; Харків. Харків: Вид-во НФаУ; 2018. с. 368–70.

19. Varianytsia VV, Vysekantsev IP. Storage of standard fixed rabies virus CVS strain in protective media with sucrose, glycerol and maltose at different temperatures during one year. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2019; 29(2): 153. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo29.02.153>.

20. **Варяниця ВВ**, Новікова ОЮ. Порівняння методів RFFIT та MNT при контролі титрів антирабічних антитіл в препараті антирабічного імуноглобуліну.

B: Proceedings of the 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation; 2019 June 18–21; Yaremche, Ukraine. Львів. С. 58.

21. **Варяниця ВВ**, Высеканцев ИП. Применение защитных сред для долгосрочного хранения фиксированного штамма вируса бешенства L. Pasteur при низких температурах. В: Збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції «Медична наука та практика: виклики і сьогодення»; 2019 Серп. 23–24; Львів. Львів: ГО «Львівська медична спільнота»; 2019. с. 87–90.

22. **Varianytsia VV**, Vysekantsev IP. Effectiveness of protective media applying for long-term storage of the rabies virus L. Pasteur strain at various low temperatures. Probl Cryobiol Cryomed. 2020; 30(3): 283. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo30.03.283>.

Патенти України на корисну модель

23. Новікова ОЮ, **Варяниця ВВ**, винахідники; патентовласник ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК». Спосіб кількісного визначення антирабічного антигену in vitro в інактивованих антирабічних вакцинах. Патент України на корисну модель №118343. Публ. 10.08.2017. Бюл. № 15.

ДОДАТОК Б

Апробація матеріалів дисертації

Апробація результатів дисертації. Результати роботи були представлені на наступних наукових конференціях:

- «Молодь і поступ біології» VIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, приурочена до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського (16–19.04.2013, Львів, Україна);
- «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии» 38-а щорічна конференція молодих вчених ІПКіК НАН України (21–22.05.2014 Трав., Харків, Україна);
- «Биология – наука XXI века» 19-а Міжнародна Пущинська школа-конференція молодих вчених (20–24.04.2015, Пушино, Росія);
- «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии» 39-а щорічна конференція молодих вчених ІПКіК НАН України (20–21.05.2015, Харків, Україна);
- «CYS-2015» перша Міжнародна конференція молодих вчених (21–25.09.15, Київ, Україна);
- «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии» 40-а щорічна конференція молодих вчених ІПКіК НАН України (23–24.05.2016, Харків, Україна);
- «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» XXIV Науково-практична конференція молодих вчених та студентів (20.04.2017, Харків, Україна);
- «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии» 41-а щорічна конференція молодих вчених ІПКіК НАН України (24–25.05.2017, Харків, Україна);
- «Smart Bio» 2-й Міжнародній конференції (03–05.05.2018, Каунас, Литва);

– «Холод у біології і медицині. Актуальні питання кріобіології, трансплантології і біотехнології» 42-а щорічна конференція молодих вчених ІПКіК НАН України (23–24.05.2018, Харків, Україна);

– «Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології» VII Науково-практична дистанційна конференція з міжнародною участю (23.11.2018, Харків, Україна);

– «Холод в біології та медицині – 2019» 43-я щорічна конференція молодих вчених ІПКіК НАН України (27–29.05.2019, Харків, Україна);

– 6-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (18–21.06.2019, Яремче, Україна);

– «Медична наука та практика: виклики і сьогодення» Міжнародна науково-практична конференція (23–24.08.2019, Львів, Україна);

– «Холод в біології та медицині – 2020» 44-а щорічна конференція молодих вчених ІПКіК НАН України (19.05.2020, Харків, Україна).

ДОДАТОК В

Матеріали допоміжного характеру

ЗАТВЕРДЖУЮ
Заступник директора ІПКіК НАН України
з наукової роботи
доктор біол. наук, професор

Бабійчук Г.О.

« 26 » 12 2018 р.

ЗАТВЕРДЖУЮ
Голова Правління
ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК»

Шарий С.М.
2018 р.

АКТ

**про впровадження результатів дисертаційної роботи
начальника відділу розробки клітинних біотехнологій
Варяниці Вікторії Валеріївни**

на тему:

«Збереженість промислових штамів вірусу сказу при низьких температурах та після ліофілізації»

на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія

Комісія у складі:

голова комісії – головний технолог Жлудько О.В.,

начальник лабораторії клітинних культур Линник В.С.,

начальник дільниці антирабічного антигену Мороз О.С.

цим Актом засвідчує, що результати дисертаційної роботи Варяниці В.В. на тему «Збереженість промислових штамів вірусу сказу при низьких температурах та після ліофілізації», виконаної на базі ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК» впродовж 2013-2017 рр. були використані співробітниками підприємства ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК» для розробки та реєстрації ветеринарного препарату «Антиген вірусу сказу для імунізації коней-продуцентів» та впроваджені у виробництво цього препарату.

Отримані результати:

- оцінка інфекційної активності суспензії вірусу сказу штамів L. Pasteur та CVS після зберігання за різних температур (37, 5, -20, -80 та -196 °C) та з різними захисними середовищами;
- визначення ефективної температури відтаювання вірусу сказу штаму L. Pasteur за різних температур (10, 20, 25, 37 °C),

- оцінка збереженості вірусу сказу штаму L. Pasteur після ліофілізації у середовищах з різними концентраціями желатину та сахарози та довгострокового зберігання за різних температур (5, -20, -80 °С),

були використані для складання та затвердження стандартних робочих методик ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК», пов'язаних з виробництвом та контролем якості ветеринарного препарату «Антиген вірусу сказу для імунізації коней-продуцентів», а саме:

- «Отримання суспензії культурального фіксованого вірусу сказу (штами L. Pasteur, CVS)»;
- «Ліофілізація фіксованого вірусу сказу (штами L. Pasteur, CVS)»;
- «Формування головного та робочого банків фіксованого вірусу сказу (штами L. Pasteur, CVS)».

Впровадження даних методик у виробництво за результатами дисертаційної роботи Варяниці В.В. дозволило удосконалити технологічний процес отримання «Антигену вірусу сказу для імунізації коней-продуцентів» за рахунок подовження терміну зберігання промислових штамів вірусу сказу та покращити результати їх інфекційної активності після довгострокового зберігання.

Голова комісії:	Головний технолог		(О.В. Жлудько)
Члени комісії:	Начальник лабораторії клітинних культур		(В.С. Линник)
	Начальник дільниці антирабічного антигену		(О.С. Мороз)

« 20 » _____ 12 _____ 2018 р.



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118343** (13) **U**
(51) МПК**G01N 33/53** (2006.01)**C40B 30/04** (2006.01)**C12Q 1/70** (2006.01)**C12R 1/93** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 12220	(72) Винахідник(и): Новікова Оксана Юрївна (UA), Варяниця Вікторія Валеріївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 01.12.2016	(73) Власник(и): ПУБЛІЧНЕ АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО "ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК", Помірки, м. Харків, 61070 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.08.2017	(74) Представник: Шевеля Микола Васильович, ресстр. №20
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.08.2017, Бюл.№ 15	

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АНТИРАБІЧНОГО АНТИГЕНУ IN VITRO В ІНАКТИВОВАНИХ АНТИРАБІЧНИХ ВАКЦИНАХ**(57) Реферат:**

Спосіб кількісного визначення антирабічного антигену in vitro в інактивованих антирабічних вакцинах, який полягає у зв'язуванні досліджуваного та стандартного антигену в двократних розведеннях з антирабічними антитілами та еталонним вірусом сказу в багатолунковому планшеті з використанням для тесту чутливої до вірусу сказу культури клітин, яку додають в усі лунки планшета і здійснюють інкубування суміші вакцин, антирабічних антитіл, вірусу сказу та чутливої до вірусу сказу культури клітин, після чого її культивують, а потім моношар клітин фарбують за допомогою FITC-мічених антитіл до нуклеопротеїну вірусу сказу, візуалізують та здійснюють облік за зараженими лунками. Кількісне визначення вмісту антирабічного антигену здійснюється шляхом реакції нейтралізації антиген-антитіло з використанням перещепленої культури клітин ВНК-21, для чого після інкубування суміші досліджуваного та стандартного антигену з антирабічними антитілами до суміші як еталонного вірусу сказу додають вірус сказу штаму CVS, а як чутливу до вірусу сказу культуру клітин додають перещепловану культуру клітин.

UA 118343 U

UA 118343 U

Корисна модель належить до медичної та ветеринарної вірусології, зокрема до лабораторних тестів з кількісного визначення антирабійного антигену у сировині при виробництві інактивованих антирабійних вакцин чи при контролі готових вакцин.

Сказ до сьогодні залишається значною медичною та соціальною проблемою у всьому світі. Це обумовлено тим, що зберігається постійна загроза зараження людей вірусом сказу, що належить до роду *Lyssavirus* родини *Rhabdoviridae*, у зв'язку з наявністю природних осередків розповсюдження цієї контагіозної нейротропної інфекції серед диких та свійських тварин. За даними ВООЗ, у світі кожен рік реєструється в середньому 50 тисяч випадків активно-пасивної обробки людей, що постраждали від укусів тварин, і 35-50 тис. випадків смерті від сказу [1]. Кількісне визначення вмісту антигену у вакцині є важливим етапом її розробки і виробництва. При цьому вдосконалення методів контролю антирабійних вакцин залишається актуальною задачею. Специфічна активність вакцини є вирішальним показником при її розробці та виробництві. Даний метод може використовуватися при дослідженні несорбованих та сорбованих інактивованих антирабійних вакцин та антигену для імунізації тварин - продуцентів антирабійної крові.

Антирабійний антиген - це інактивовані вірус сказу фіксованого штаму, що може бути сировиною для отримання антирабійних вакцин;

Антирабійна вакцина - це антирабійний антиген, очищений шляхом фільтрації та/або сорбції на адванті та призначений для стимуляції вироблення антирабійних антитіл при введенні в організм людини та тварин (наприклад, антирабійні вакцини для людини Verorab, Indirab, КОКАВ);

Чутлива до вірусу сказу культура клітин - культура клітин, що має на поверхні мембрани рецептори, для зв'язування з поверхневими білками вірусу; чутливі культури здатні уражатись відповідним вірусом, використовуються для його культивування (наприклад, чутливі до вірусу сказу культури ВНК-21, Vero, Neuro-2a тощо);

Пожиле середовище - рідке середовище, що має стандартизований вміст розчинених поживних речовин (амінокислот, солей, додаткових факторів), що необхідні для росту клітин, використовується для культивування клітин *in vitro* (наприклад MEM, DMEM, GMEM);

Первинна культура клітин - культура клітин, отримана шляхом дезагрегації тканини, що має обмежену кількість поділів, культура клітин є первинною до першого пасажу (наприклад, первинна культура ембріонів курей, первинна культура нирок сирійського хом'ячка);

Перещеплювана культура клітин - культура клітин, отримані шляхом трансформації з первинної культури клітин, мають необмежену кількість поділів при культивуванні *in vitro* (наприклад, культури ВНК-21, Vero, Neuro-2a, SPEV тощо);

Досліджувана вакцина - вакцина, активність якої встановлюється в ході поточного досліджу;

Стандартна антирабійна вакцина - 2 міжнародний стандарт антирабійної вакцини, отриманий в інституті NIBSC;

Нуклеопротеїн вірусу сказу - комплекс геномної РНК вірусу, зв'язаний з N-протеїном, являє собою компактизований геном вірусу;

FITC-мічені антитіла - антитіла до поверхневого глікопротеїну вірусу сказу; при зв'язуванні з цим білком, утворює комплекси антиген-антитіло, що випромінює специфічне зелене світіння при опроміненні ультрафіолетом.

Найбільш розповсюдженим способом визначення активності вакцин є тест визначення імуногенності на мишах - NIH-тест на мишах Wibur L. A., Aubert F. A. The NIH test for potency test // Laboratory Techniques in Rabies, World Health Organization. - Switzerland, Geneva. - 1996. - 4th-p. 360-368 [2]. Однак, наведений метод потребує значних витрат часу (час виконання 60 днів), а також пов'язаний з використанням дорогіших лінійних лабораторних мишей. Процес виробництва антирабійних препаратів потребує застосування більш швидких проміжних методів визначення антирабійного антигену.

Більшість способів визначення антитіл чи антигенів збудників базується на їхній здатності до нейтралізації *in vitro* з утворенням комплексів антиген-антитіло. Було запропоновано спосіб визначення антигену шляхом поетапного зв'язування глікопротеїну вірусу сказу в досліджуваних зразках з первинними, а потім-вторинними антитілами, що містять флуоресцентну мітку (Smilt, Todd, Ruprech, Charles Assay for analyses of rabies virus glycoprotein, WO2014056434-17.04.14) [3]. Реєструється безпосередньо сигнал вторинних антитіл, що утворили комплекси. Результати вимірювань дослідних зразків порівнюються з контролем міжнародного стандартного зразка антигену, що дозволяє виражати результат в МО. Спосіб є досить експресним та точним, проте потребує застосування специфічних первинних та вторинних антитіл, що здорожує контроль. В той час, як запропонований нами метод не

UA 118343 U

потребує додаткових реактивів та матеріалів, окрім тих, що використовуються при виробництві інактивованих вакцин.

Відомий спосіб кількісного визначення антирабійного антигену *in vitro* в культуральних інактивованих антирабійних вакцинах, який полягає у зв'язуванні досліджуваного та стандартного антигену в двократних розведеннях з антирабійними антитілами та еталонним вірусом сказу в багатолунковому планшеті з використанням для тесту чутливої до вірусу сказу культури клітин, яку додають в усі лунки планшета і здійснюють інкубування суміші вакцин, антирабійних антитіл, вірусу сказу та чутливої до вірусу сказу культури клітин, після чого її культивують, а потім моношар клітин фарбують за допомогою FITC-мічених антитіл до нуклеопротеїну вірусу сказу, візуалізують та здійснюють облік за зараженими лунками (Barth, R. The Modified antibody-binding test for the *in vitro* quantification of rabies virus antigen in inactivated rabies vaccines [text]/ Laboratory Techniques in Rabies. World Health Organization, - Switzerland, Geneva, - 1996. - 4th-р. 394-397.) Даний спосіб вибрано як прототип. Цей спосіб має назву модифікований тест зв'язування антитіл (modified antibody-binding test-MABT) [4]. Принцип методу полягає в двохетапній нейтралізації досліджуваних вакцин зі стандартом імуноглобуліну, а потім - надлишку реакції з живим вірусом сказу штаму Flury HEP 34. Спосіб складається з трьох принципових етапів:

1. Приготування серійних двократних розведень досліджуваних та стандартної антирабійних вакцин.

2. Приготування розчину стандарту антирабійного імуноглобуліну та додавання його до вакцин для проведення реакції нейтралізації антиген-антитіло;

3. Приготування робочого розведення вірусу штаму Flury HEP 34 та його додавання до реакційної суміші для виявлення нез'язаних антитіл.

У цьому методі як чутливий об'єкт використовується первинна культура клітин ембріонів курей. Здійснюється висів культури клітин в 96-лунковий планшет, після чого вони інкубуються в умовах CO₂-інкубатора при стандартній температурі культивування 37 °C протягом 24±2 годин (при досягненні конфлюентності моношаром). На другий день тесту в пробірках готуються дворазові (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) розведення досліджуваної і стандартної вакцин (відкаліброваної відповідно до 2 Міжнародного Стандарту антирабійної вакцини). Суміш інкубується в умовах CO₂-інкубатора при 37 °C протягом години. Далі до суміші вакцин та імуноглобуліну додається еквівалентна кількість біомаси вірусу штаму Flury HEP 34 з активністю 5000 TCID₅₀/мл. Через годину інкубування суміш вакцин, антирабійних антитіл та вірусу (далі - реакційна суміш) вноситься до 24-годинного моношару клітин первинної культури клітин ембріонів курей. Далі клітини культивуються протягом 72 годин, після чого моношар фіксується, забарлюється за допомогою FITC-мічених антитіл до нуклеопротеїну вірусу сказу, а далі візуалізується за допомогою люмінесцентного мікроскопа. Облік проводиться за позитивними лунками. Позитивною вважається лунка, в якій розмноження вірусу пригнічене в результаті впливу вільних нейтралізуючих антитіл. В лунках, де така інгібіція вірусу не відбулась, реєструється один чи більше флуоресцентних фокусів вірусу.

Описаний метод має ряд недоліків:

1. Одержання первинної культури клітин з курячих ембріонів відбувається шляхом їх ферментативної дезінтеграції. Ця процедура є тривалою та трудомісткою, отримані культури тканин є не стандартизованими. Кількість їх поділів *in vitro* обмежена, що викликає труднощі зі збереженням показників стабільності об'єкта.

2. Не виключена можливість контамінації культур латентними вірусами та мікоплазмами. З цих причин, на сьогодні у всьому світі для проведення досліджень *in vitro* використовуються стандартизовані та паспортизовані культури клітин з сертифікованих колекцій та банків.

3. Тривалість тесту до отримання результатів становить 4 доби, клітини виконаного моношару складніше і повільніше уражаються вірусом, це збільшує час тесту.

4. Штам вірусу Flury HEP 34 на сьогодні не використовується в світі як стандартний штам.

В основу корисної моделі поставлена задача більш швидкого та точного визначення антигену в антирабійних вакцинах при стандартизованих умовах.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі кількісного визначення антирабійного антигену *in vitro* в інактивованих антирабійних вакцинах, який полягає у зв'язуванні досліджуваного та стандартного антигену в двократних розведеннях з антирабійними антитілами та еталонним вірусом сказу в багатолунковому планшеті з використанням для тесту чутливої до вірусу сказу культури клітин, яку додають в усі лунки планшета і здійснюють інкубування суміші вакцин, антирабійних антитіл, вірусу сказу та чутливої до вірусу сказу культури клітин, після чого її культивують, а потім моношар клітин фарбують за допомогою FITC-мічених антитіл до нуклеопротеїну вірусу сказу, візуалізують та здійснюють облік за

UA 118343 U

- зараженими лунками, згідно з корисною моделлю, кількісне визначення вмісту антирабінного антигену здійснюється шляхом реакції нейтралізації антиген-антитіло з використанням перещеплюваної культури клітин ВНк-21, для чого після інкубування суміші досліджуваного та стандартного антигену з антирабінними антитілами до суміші як еталонний вірус сказу додають вірус сказу штаму CVS, а як чутливий до вірусу сказу культури клітин додають перещеплювану культуру клітин.
- 5 Перещеплювану культуру клітин вибирають з групи L929, 3T3 і ВНк-21.
Як чутливий до вірусу сказу культури клітин вибирають перещеплювану культуру клітин ВНк-21.
- 10 Відповідно до корисної моделі здійснюють попереднє приготування реакційної суміші з подальшим внесенням суспензії клітин.
Принцип методу полягає в інкубуванні досліджуваного та стандартного антигену з антирабінними антитілами протягом 60 хвилин в умовах CO₂-інкубатора при температурі близько 37 °С, після чого додається суспензія вірусу сказу штаму CVS (Challenge Virus Standard) і суміш інкубується ще близько 60 хвилин в аналогічних умовах. Після цього в суміш вноситься суспензія культури клітин ВНк-21 (культура клітин нирки сирійського хом'яка), клітини з інокульованою в них сумішшю культивуються протягом 2 діб. Потім моношар клітин фіксується 85 % охолодженим ацетоном та фарбується за допомогою FITC-мічених антитіл до антигену вірусу сказу та аналізуються за допомогою імуофлуорисцентного методу.
- 15 Таким чином, оптимізація нами способу кількісного визначення антирабінного антигену *in vitro* в інактивованій культуральній антирабінній вакцині полягає в наступному: 1) використання для тесту чутливої до вірусу сказу перещеплюваної культури клітин ВНк-21 замість первинної; 2) застосування еталонного штаму вірусу сказу (штам CVS); 3) попереднє приготування реакційної суміші з безпосереднім внесенням до неї суспензії клітин, що скорочує час дослідження та робить інфікування клітин більш ефективним та доступним для спостереження.
- 20 Методика виконується таким чином: до всіх лунок 96-лункового планшета за допомогою багатоканального дозатора вноситься поживне середовище (Ігла MEM або DMEM) (див. таблицю). До лунок 1-4 ряду А вноситься стандартна антирабінна вакцина, в лунки 5-9 та 9-12 рядів А та Е вносяться досліджувані вакцини. Шляхом піпетування готуються двократні (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) розведення досліджуваних і стандартної вакцин, середовище, що залишилось в процесі фільтрації, видаляється з останньої лунки. В лунки Е1-Н4 96-лункового планшета вакцини не додаються, ці лунки залишаються для постановки позитивного та негативного контролів вірусу.
- 25 Готується робоче розведення стандарту антирабінного імуноглобуліну (відкаліброваного за Шостим Міжнародним стандартом антирабінного імуноглобуліну) зі специфічною активністю 0,6-0,7 МО/мл (кінцева активність становить 0,3-0,35 МО/мл). Розчин імуноглобуліну інокулюється до всіх лунок, окрім лунок Е1-Н2. Дана суміш (вакцина та імуноглобулін) інкубується протягом 1 години в CO₂-інкубаторі при температурі близько 37 °С.
- 30 Після цього в усі лунки планшета (окрім Е1-Н2) додається вірус CVS, розбавлений живильним середовищем до активності 5000 CCID₅₀/мл. Паралельно у лунках Е1-Н3 готується 4 послідовних п'ятикратних розведення (1:5, 1:25, 1:125, 1:625) вірусу CVS для контролю з метою уточнення наявності необхідної інфекційної активності. Лунки Е3-Н3 залишаються вільними для контролю ростових якостей культури клітин ВНк-21, що використовується для дослідів.
- 45 Після цього до суміші вноситься суспензія культури клітин ВНк-21 в концентрації 2 млн клітин/мл. Планшети залишаються для інкубування в умовах CO₂-інкубатора при температурі близько 37 °С з 5 % CO₂ в атмосфері.

Таблиця

Схема 96-лукового планшета та розведення розчинів в ньому

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	стандарт 1: 2	стандарт	стандарт	стандарт	№1 1: 2	№1	№1	№1	№3 1: 2	№3	№3	№3
B	1: 4				1: 4				1: 4			
C	1: 8				1: 8				1: 8			
D	1:16				1:16				1:16			
E	CVS 1: 5	CVS	K- BHK-21	K	№2 1: 2	№2	№2	№2	№4 1: 2	№4	№4	№4
F	1: 25				1: 4				1: 4			
G	1: 125				1: 8				1: 8			
H	1: 625				1:16				1:16			

Далі до реакційної суміші в усі лунки планшета вноситься суспензія 2-добової культури клітин ВНК-21 в концентрації 2,5 млн клітин/мл. Через термін в межах 48 годин культивування, моношар клітин фіксується 85 % охолодженим ацетоном протягом близько 30 хвилин. Після фіксації моношар фарбується за допомогою FITC-мічених антитіл до нуклеопротеїну вірусу свазу та візуалізується за допомогою флуоресцентного мікроскопа (об'єктив Х10, окуляр Х20). Облік здійснюється за позитивними лунками, в яких розмноження вірусу не пригнічене в результаті впливу вільних нейтралізуючих антитіл якого в кожній лунці переглядають послідовні поля зору, і як позитивні відзначають поля, що містять хоча б один фокус, що флуоресцює.

Математична обробка результатів тесту проводиться методом Spearman-Kärber за формулою:

$$\lg ED_{50} = (x_0 - d/2 + dZr/n), \text{ де:}$$

x_0 - lg найбільшого розведення досліджуваного антигену, всі лунки якого позитивні;

d - lg фактора розведення антигена;

n - загальна кількість лунок, що припадають на кожне розведення антигену;

r - кількість позитивних лунок в кожному розведенні антигену;

Перерахунок в МО/мл здійснюється за формулою:

$$\text{Кількість МО/мл в досліджуваному антигені} = 10^{(\lg ED_{50} (\text{досліджуваного антигену}) - \lg ED_{50} (\text{стандарту вакцини}))} \times \text{кількість МО/мл в стандарті вакцини (1 МО/мл)}$$

Приклад 1

До всіх лунок 96-лукового планшета за допомогою багатоканального дозатора вноситься по 50 мкл поживного середовища (Ігла MEM або DMEM). До лунок 1-4 ряду А вноситься по 50 мкл стандартної антирабійної вакцини, в лунки 5-9 та 9-12 рядів А та Е вноситься по 50 мкл досліджуваних вакцин (по 4 лунки на 1 зразок вакцини). Шляхом піпетування готуються двократні (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) розведення досліджуваних і стандартної вакцин, 50 мкл середовища з останньої лунки видаляється.

Готується робоче розведення стандарту антирабійного імуноглобуліну (відкаліброваного за Шостим Міжнародним стандартом антирабійного імуноглобуліну) зі специфічною активністю 0,6 МО/мл (кінцева активність становить 0,3 МО/мл). Розчин імуноглобуліну інокулюється до всіх лунок, окрім лунок Е1-Н2. Дана суміш (вакцина та імуноглобулін) інкубується протягом 1 години в CO₂-інкубаторі при 37 °С.

Суспензія вірусу CVS з активністю 5*10⁶, що зберігається в замороженому стані при -70 °С розморозжується на водній бані з температурою +10-15 °С. Після чого розводиться охолодженим середовищем DMEM 1:1000 (до активності 5000 CCID₅₀). Після цього в усі лунки планшета, окрім від Е1 до Н2 включно, додають вірус CVS, розбавлений живильним середовищем до активності 5000 CCID₅₀. Паралельно у лунках Е1-Н2 готується 4 послідовних п'ятикратних розведення (1:5, 1:25, 1:125, 1:625) вірусу CVS для контролю активності вірусу.

Планшети залишаються для інкубування в умовах CO₂-інкубатора при 37 °С з 5 % CO₂ в атмосфері.

Моношар культури клітин ВНК-21, що культивувалась протягом двох діб з моменту попереднього пасажування, диспергується за допомогою 0,05 % розчину трипсину у розчині Версена. Здійснюється підрахунок концентрації клітин в камері Горяєва. Здійснюється

UA 118343 U

розрахунок, і суспензія в культуральному флаконі розводиться поживним середовищем до концентрації 5×10^5 клітин в мілілітрі. Далі до реакційної суміші в планшеті, до всіх лунок додається по 100 мкл приготованої клітинної суспензії.

Через період часу близько 48 годин культивування, моношар клітин фіксується 85 % охолодженим ацетоном протягом близько 30 хвилин. Після фіксації моношар фарбується за допомогою FITC-мечених антитіл до нуклеопротеїну вірусу сказу та візуалізується за допомогою флуоресцентного мікроскопа (об'єктив X10, окуляр X20).

Облік проводиться за позитивними лунками, в яких розмноження вірусу не пригнічене в результаті впливу вільних нейтралізуючих антитіл. Наприклад, в зразку досліджуваної вакцини були отримані наступні результати: в розведенні. Приклад підрахунку кількості антирабійного антигену.

Активність вакцини:

$$\lg ED_{50} = x_0 - d/2 + d \Sigma r/n_i = 0,60 - 0,3/2 + 0,3 (4/4 + 2/4) = 0,60 - 0,15 + 0,45 = 0,90.$$

Активність вакцини в МО/мл:

$$0,90/0,45 \times 1 = 2 \text{ МО/мл.}$$

Таким чином, наведений спосіб має наступні переваги в порівнянні з прототипом:

1. Використанням для тесту чутливої до вірусу сказу перещеплюваної культури клітин ВНК-21 замість первинної, що дозволяє стандартизувати культуру для виконання методу та уникнути необхідності проводити додаткові контролі об'єкта в ході самого тесту.

2. Зміна послідовності проведення реакції нейтралізації та вирощування моношару клітин, а саме - додавання до реакційної суміші суспензії клітин, дозволяє вирішити одразу дві задачі: скорочує час проведення тесту, а також збільшується площа поверхні, що контактує з вірусом, і може більш ефективно інфікуватися. В прототипі спочатку відбувається отримання та культивування первинної культури клітин протягом 24 годин, після чого проводиться реакція поетапної нейтралізації антиген-антитіло-вірус, яка вноситься до моношару, і культивується протягом 72 годин. Таким чином, весь час тесту становить 96 годин (4 доби), тоді як наведений спосіб дозволяє отримувати аналогічні результати протягом 48 годин.

3. Застосування еталонного штаму вірусу сказу (штам CVS), що відповідає сучасним вимогам та дозволяє порівнювати результати тесту з результатами інших лабораторій, де використовують стандартний штаб.

4. Всі операції виконуються на одному 96-лунковому культуральному планшеті, що дає змогу компактно розмістити необхідні контролі (контроль антирабійної вакцини, контроль антирабійного імуноглобуліну, вірусу та культури клітин) та досліджувані зразки - в кількості 4 зразки в одній реакції, в 4 аналогічних повторях кожен.

Джерела інформації:

1. Пухова, Н.М. Универсальная антирабическая вакцина для животных и критерии ее эффективности [текст] // Самуйленко А.Я., Еремеев И.В. и др. Известия Самарского научного центра РАН. - 2011. - т. 13, № 5(3). - с. 175-177.

2. Aubert M.F. A. Methods of the calculation of titres. Appendix 3 [text] // Laboratory Techniques in Rabies. World Health Organization. - Switzerland, Geneva. - 1996. - 4th. p. 445-447.

3. Smith, Todd, Ruprech, Charles Assay for analyses of rabies virus glycoprotein WO2014059434-17.04.14.

4. Barth, R. The Modified antibody-binding test for the in vitro quantification of rabies virus antigen in inactivated rabies vaccines [text] // Laboratory Techniques in Rabies. World Health Organization. - Switzerland, Geneva. - 1996. - 4th. - p. 394-397.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб кількісного визначення антирабійного антигену *in vitro* в інактивованих антирабійних вакцинах, який полягає у зв'язуванні досліджуваного та стандартного антигену в двократних розведеннях з антирабійними антитілами та еталонним вірусом сказу в багатолунковому планшеті з використанням для тесту чутливої до вірусу сказу культури клітин, яку додають в усі лунки планшета і здійснюють інкубування суміші вакцин, антирабійних антитіл, вірусу сказу та чутливої до вірусу сказу культури клітин, після чого її культивують, а потім моношар клітин фарбують за допомогою FITC-мечених антитіл до нуклеопротеїну вірусу сказу, візуалізують та здійснюють облік за зараженими лунками, який відрізняється тим, що кількісне визначення вмісту антирабійного антигену здійснюється шляхом реакції нейтралізації антиген-антитіло з використанням перещеплюваної культури клітин ВНК-21, для чого після інкубування суміші досліджуваного та стандартного антигену з антирабійними антитілами до суміші як еталонного

UA 118343 U

- вірусу сказу додають вірус сказу штаму CVS, а як чутливу до вірусу сказу культури клітин додають перещеплювану культуру клітин.
2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що перещеплювану культуру клітин вибирають з групи L929, 3T3 і ВНК-21.
- 5 3. Спосіб за п. 1 або 2, який відрізняється тим, що як чутливу до вірусу сказу культури клітин вибирають перещеплювану культуру клітин ВНК-21.
4. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-3, який відрізняється тим, що здійснюють попереднє приготування реакційної суміші з подальшим внесенням суспензії клітин.
- 10 5. Спосіб за п. 4, який відрізняється тим, що в 96-лунковому планшеті з дванадцятьма вертикальними та вісьмома горизонтальними від А до Н рядами лунок паралельно до всіх лунок вносять поживне середовище, до лунок від першої до четвертої включно ряду А вносять стандартну антирабійну вакцину, в лунки від п'ятої до восьмої включно та від дев'ятої до дванадцятої включно рядів А та Е вносять досліджувані вакцини, шляхом піпетування готують двократні розведення досліджуваних і стандартної вакцин, середовище, що залишилось в процесі фільтрації, видаляють з останньої лунки, в лунки від Н1 до Н4 включно вакцини не додають, готують робоче розведення стандарту антирабійного імуноглобуліну, що суміш інкубують в CO₂-інкубаторі при заданій температурі, після інкубації в усі лунки планшета окрім від Н1 до Н2 включно додають вірус CVS, розбавлений живильним середовищем до активності 5000 CCID50/мл, паралельно у лунках від F1 до H2 включно готують чотири послідовних п'ятикратних розведення вірусу CVS, планшети залишають для інкубування в умовах CO₂-інкубатора при заданій температурі з 5 % CO₂ в атмосфері, далі до реакційної суміші в усі лунки планшета вносять суспензію дводобової культури клітин ВНК-21 в концентрації 2,5 млн клітин/мл, при цьому в лунках Е1-Е4 включно контролюють ростові властивості культури клітин, через період часу біля 48 годин культивування моношар клітин фіксують охолодженням 85 %
- 25 ацетоном біля 30 хвилин, після фіксації моношар фарбують та візуалізують за допомогою флуорисцентного мікроскопа і здійснюють облік за позитивними лунками, в яких розмноження вірусу не пригнічене в результаті впливу віпних нейтралізуючих антитіл, при цьому здійснюється підрахунок полів зору в лунці, під час якого в кожній лунці переглядають послідовні поля зору, і як позитивні відзначають поля, що містять хоча б один фокус, що флуоресцює.
- 30

Комп'ютерна версія Л. Литвиненко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601