

УДК 578.347:57.043:615.371

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

## Методы хранения сложных РНК-содержащих вирусов

UDC 578.347:57.043:615.371

V.V. Varyanytsia<sup>1,2\*</sup>, I.P. Vysekantsev<sup>1</sup>

## Storage Methods of Complex RNA Viruses

**Реферат:** В обзоре рассматривается разработка методов долгосрочного хранения сложных РНК-содержащих вирусов. Необходимость представленной работы обусловлена значительным распространением инфекционных заболеваний, вызванных данными вирусами, и увеличением количества исследований, направленных на разработку препаратов для иммунопрофилактики и иммунотерапии. Технологии производства этих препаратов включают этапы долгосрочного хранения вирусов, для консервирования которых используют лиофилизацию и хранение при температурах ниже 0°C. Однако в настоящее время отсутствуют общепринятые подходы к выбору состава защитных сред для лиофилизации или низкотемпературного хранения вирусов. С этой целью применяют добавки и комбинации различных сахаров, многоатомных спиртов, белков животного происхождения, химических соединений. Для хранения лиофилизированных вирусов используют температуры 4 или –20°C, а для хранения вирусов в замороженном состоянии – от –60 до –85°C, что обусловлено доступностью морозильных камер, обеспечивающих указанные температурные режимы, и высокой сохранностью вирусов разных семейств.

**Ключевые слова:** сложные РНК-содержащие вирусы, долгосрочное хранение, лиофилизация, стабилизирующие вещества, защитные среды, сохранность вируса, вакцина.

**Реферат:** В огляді розглянуто розробку методів довгострокового зберігання складних РНК-вмісних вірусів. Необхідність даної роботи обумовлена значним розповсюдженням інфекційних захворювань, які викликані даними вірусами, та збільшенням кількості досліджень, спрямованих на розробку препаратів для імунопрофілактики та імунотерапії. Технології виробництва цих препаратів включають етапи довгострокового зберігання вірусів для консервування яких використовують ліофілізацію та зберігання за температури нижче 0°C. Але на сьогодні відсутні загальноприйняті підходи до вибору складу захисних середовищ для ліофілізації або низькотемпературного зберігання вірусів. З цією метою застосовують домішки та комбінації різних цукрів, багатоатомних спиртів, білків тваринного походження, хімічних сполук. Для зберігання ліофілізованих вірусів використовують температури 4 або –20°C, а для збереження вірусів у замороженому стані – від –60 до –85°C, що обумовлено доступністю морозильних камер, які забезпечують вказані температурні режими, та високою схоронністю вірусів різних сімейств.

**Ключові слова:** складні РНК-вмісні віруси, довгострокове зберігання, ліофілізація, стабілізуючі засоби, захисні середовища, вірус, вакцина.

**Abstract:** The review describes the development of methods for the long-term storage of complex RNA viruses. The need of such an activity is stipulated by a wide spreading of infectious diseases caused by these viruses and rising number of the studies dealing with developing of the biologicals for immunoprophylaxis and therapy. Among other things the technology for these preparations production involves the long-term storage of viruses. This includes freeze-drying and storage at temperatures below 0°C. However, to date no generally accepted approaches exist in terms of composition of protective media for either freeze-drying or low-temperature storage of viruses. For this purpose, one uses the numerous additives and combinations of various sugars, polyhydric alcohols, animal proteins, chemical compounds. Storage of frozen-dried viruses is performed at either 4 or –20°C, and in case of a frozen state it ranges from –60 to –85°C, that is stipulated by the availability of freezing chambers providing these temperatures, and high survival of viruses from different families.

**Key words:** complex RNA viruses, long-term storage, freeze-drying, stabilizing substances, protective media, virus preservation, vaccine.

В мире ежегодно от острых инфекционных заболеваний вирусного происхождения погибает от 10 до 14 млн человек. В большинстве случаев причиной летального исхода являются кишечные и респираторные инфекции, однако, кроме нозологических форм инфекций, вирусы могут индуцировать злокачественные заболевания, болезни центральной нервной и иммунной систем, вызывать обостре-

From 10 to 14 million people die annually worldwide from acute infectious diseases of a viral origin. In most cases, the cause of death is intestinal and respiratory infections. Nevertheless, in addition to nosological forms of infections, viruses can induce malignant diseases, cause pathologies of the central nervous and immune systems, provoke aggravations of cardiovascular, urinary, endocrine and gastrointestinal tract pathologies [15].

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

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

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:

ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,  
электронная почта: vvvaryanitsa@biolik.com.ua

Поступила 18.09.2017

Принята в печать 01.11.2017

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

<sup>2</sup>Public Joint Stock Company 'PHARMSTANDARD-BIOLIK', Kharkiv, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.:+380 57 3737435, fax: +380 57 373 5952,  
e-mail: vvvaryanitsa@biolik.com.ua

Received October, 18, 2017

Accepted November, 01, 2017

ния патологических состояний со стороны сердечно-сосудистой, мочевой, эндокринной систем и желудочно-кишечного тракта [3].

В борьбе с вирусными инфекциями основное место занимает иммунопрофилактика, для которой необходима разработка вакцин, специфических иммуноглобулинов и диагностикумов. В этой связи важно изучение ультраструктурной организации и физиологии вирусов, а также создание необходимых запасов производственных штаммов вирусов. С этой целью создаются коллекции и производственные банки вирусов [1, 3, 5, 27].

Иммуногенность вакцин зависит от инфекционной активности вируса, который используется для их получения. Наличие поврежденных и инактивированных частиц в вирусных препаратах значительно снижает достоверность результатов и воспроизводимость диагностических тестов на основе нейтрализации вирусов. Это объясняет необходимость разработки эффективных методов долгосрочного хранения вирусов в условиях производства [15, 20].

Общей особенностью вирусов является отсутствие клеточного строения, тем не менее они различаются по составу, структуре, размерам и устойчивости к физико-химическим факторам [18], что важно учитывать при выборе методов их долгосрочного хранения. Вирионы, или вирусные частицы, могут быть простыми или сложными. Сложные вирусы отличаются от простых наличием суперкапсида – оболочки, которая состоит из фрагментов двухслойной клеточной мембраны клетки-хозяина, обогащенных вирусными белками. Носителем генетической информации вирусов является один из типов нуклеиновой кислоты – ДНК либо РНК. Большая часть вирусов человека и животных содержат РНК [3]. Показано, что инфекционная активность ряда вирусов может быстро снижаться при температурах от 4 до  $-20^{\circ}\text{C}$  и не изменяться на протяжении нескольких лет после хранения при температурах от  $-120$  до  $-196^{\circ}\text{C}$  или в лиофилизированном состоянии [12, 27].

В данной работе рассмотрены существующие способы хранения сложных РНК-содержащих вирусов на примере представителей семейств *Paramyxoviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Togaviridae* и *Rabdoviridae*.

В практической медицине, фармацевтической промышленности и при производстве ветеринарных препаратов для хранения вирусов и структурных компонентов вирионов широко используют лиофилизацию – высушивание предварительно замороженных биологических объектов [3, 7, 19, 26]. Недостатком этого способа консервирования является более короткий срок хранения по сравнению с низкотемпературным консервированием [7, 12, 20].

A significant role in the therapy of viral infections is occupied by immunoprophylaxis, which requires the development of vaccines, specific immunoglobulins and diagnostic systems. In this regard, it is important to study the ultrastructural organization and physiology of viruses, as well as to create the essential stocks of industrial strains. For this purpose, the collections and operational banks of viruses are established [3, 15, 23, 27].

Immunogenicity of vaccines depends on the infectious activity of the virus, which is used for their production. The presence of damaged and inactivated particles in viral suspensions significantly reduces the reliability of the results and reproducibility of diagnostic tests based on virus neutralization. This highlights the need for effective methods of the long-term storage of viruses intended for production issues [11, 17].

A common feature of viruses is the absence of a cell-like structure, nevertheless, they differ in composition, structure, size and resistance to physicochemical factors [14], that is important for choosing the methods for their long-term storage. Virions, or viral particles, can be either simple or complex. Complex viruses differ from simple ones by the presence of a supercapsid. *i. e.* a shell, which consists of the fragments of a bilayer cell membrane of the host cell enriched with viral proteins. The carrier of genetic information of viruses is one of the types of nucleic acid, either DNA or RNA. Most of the human and animal viruses contain RNA [15]. It is shown that the infectious activity of a number of viruses can rapidly decrease at temperatures from 4 down to  $-20^{\circ}\text{C}$  and stay unchanged for several years after storage at temperatures from  $-120$  to  $-196^{\circ}\text{C}$  or in a frozen-dried state [8, 27].

In this paper we review the existing methods of the storage of complex RNA-containing viruses as exemplified by the representatives of the *Paramyxoviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Togaviridae* and *Rabdoviridae* families.

Practical medicine, pharmaceutical industry and production of veterinary preparations widely apply freeze-drying, *i. e.* drying of biological objects from a pre-frozen state for the storage of viruses and structural components of virions [1, 15, 16, 26]. The disadvantage of this method of preservation is a shorter shelf life if compared with low-temperature preservation [1, 8, 17].

The survival of viruses during freeze-drying is affected by the conditions of the drying process itself, the specimen preparing and composition of protective media. Drying conditions include cooling regimens, the sublimation onset temperature, the vacuumation power of the sublimation chamber, and provision of the required residual moisture values. The parameters of technological process of freeze-drying are



На сохранность вирусов в ходе лиофилизации влияют этапы процесса высушивания, подготовка материала и состав защитных сред. К условиям высушивания относятся режимы охлаждения, температура начала сублимации, степень вакуумирования камеры установки для сублимации, обеспечение необходимых значений остаточной влажности. Параметры технологического процесса лиофилизации определяются конструктивными особенностями используемого оборудования. Для лиофилизации вирусов чаще используют медленное охлаждение, поскольку инфекционная активность лиофилизированных вирусов после быстрого охлаждения снижается [19]. Важно, что применение высокой степени очистки вирусных препаратов от клеточного детрита и белков среды культивирования с помощью ультрацентрифугирования или ультрафильтрации вызывает дополнительную гибель вирионов, так как белки, содержащиеся в среде культивирования, стабилизируют суперкапсид вирионов [3]. В ряде случаев при добавлении в защитную среду некоторых стабилизирующих веществ также происходит снижение инфекционной активности вирусов. Это обусловлено образованием прочных химических связей данных веществ с вирионами в процессе лиофилизации, что приводит к инактивации вирусов [3, 19].

Кроме того, одним из факторов, определяющих эффективность процесса лиофилизации с применением стабилизирующих веществ, является поддержание оптимальной осмолярности и pH в пределах от 7,0 до 8,0 [12, 14, 18, 19, 27]. Как правило, среда для хранения вируса должна содержать буферы для поддержания pH и другие вещества, которые контролируют осмолярность раствора или на которых вирус может адсорбироваться [18]. В качестве стабилизирующих веществ при лиофилизации вирусов используют отдельно или в разных комбинациях желатин, сахарозу, обезжиренное молоко, глутамат натрия, сыворотку крови позвоночных и ее компоненты (таблица) [18, 19]. Результаты исследования применения безбелковых сред для лиофилизации, содержащих лецитин, тиомочевину, сульфат натрия, полиалкоголин, поливинилпирролидон, полиэтиленоксид, сахарозу, сорбит, показали, что они могут оказывать положительное влияние на сохранность вирусов. Однако при хранении в течение 2–3 лет (при 4 и  $-20^{\circ}\text{C}$ ) вирусов, лиофилизированных в таких средах, происходила их гибель [3], причины которой недостаточно изучены. Механизмы действия защитных веществ, используемых при лиофилизации вирусов различны. Так, известна способность некоторых сахаров образовывать водородные связи с полярными и заряженными группами структурных компонентов вирионов по мере удаления воды при высушивании, что предотвращает повреждение

determined by the features of the used equipment operation. For freeze-drying of viruses, slow cooling is often used, since an infectious activity of lyophilized viruses decreases after a rapid cooling [16]. It is important to note that the high-rate purification of viral preparations from cellular detritus and proteins of the culture medium by means of either ultracentrifugation or ultrafiltration causes an additional death of virions, as proteins contained in the culture medium stabilize the supercapsid of virions [15]. In a number of cases, when certain stabilizing substances are added to a protective medium, the infectious activity of viruses also decreases. This is due to the formation of strong chemical bonds of these substances with virions during freeze-drying, which leads to the inactivation of viruses [15, 16].

In addition, one of the factors determining the effectiveness of freeze-drying with the use of stabilizing substances is the maintenance of optimal osmolarity and pH within the range from 7.0 to 8.0 [8, 10, 14, 16, 27]. Typically, the virus storage medium should contain buffers to maintain pH and other substances that control the osmolality of the solution, or on which the virus can be adsorbed [14]. As stabilizing substances during freeze-drying of viruses, gelatin, sucrose, skimmed milk, sodium glutamate, vertebrate blood serum and its components are used alone or in various combinations (Tables) [14, 16]. The results of the study about using protein-free media containing lecithin, thiourea, sodium sulfate, polyalcoholine, polyvinylpyrrolidone, polyethylene oxide, sucrose, sorbitol for freeze-drying showed that they can positively affect the survival of viruses. Nevertheless, storage for 2–3 years at 4 and  $-20^{\circ}\text{C}$  of the viruses frozen-dried in such media results in their death [15] and the reasons for this are still not clear. The mechanisms of action of protective substances used in freeze-drying of viruses are different. Indeed, there is an ability of some sugars to form hydrogen bonds with polar and charged groups of structural components of virions as the water is removed during drying, that prevents the damage of biomolecules [16, 25]. Sodium glutamate neutralizes the carbonyl groups in the protective medium, which can adversely affect viral proteins during freeze-drying [16]. Protective effect on viruses is rendered by introduction of proteins of animal origin into the preserving medium. These proteins, as the authors believe, hamper the pH change, adhering the virus particles and other processes that cause a damage to virions [8, 27]. High efficiency of freeze-drying of viruses was demonstrated by using the compositions of culture media, carbohydrates and polypeptides [5, 15, 19]. For the effective storage of the frozen-dried viruses, as well as of other microorganisms, the certain values of residual moisture are needed. The majority of authors determined the



биомолекул [19, 25]. Глутамат натрия нейтрализует в защитной среде карбонильные группы, которые могут негативно влиять на вирусные белки в процессе лиофилизации [19]. Защитное действие на вирусы оказывает внесение в консервирующую среду белков животного происхождения. Эти белки, по мнению некоторых авторов, препятствуют изменению pH, слипанию вирусных частиц и другим процессам, вызывающим повреждение вирионов [12, 27]. Высокую эффективность при лиофилизации вирусов показывают композиции из сред культивирования, углеводов и полипептидов [3, 9, 19]. Для эффективного хранения лиофилизированных вирусов так же, как и для хранения других микроорганизмов, необходимы определенные значения остаточной влажности. Большинство авторов установлены оптимальные значения этого показателя для вирусов 1–3% [3, 7, 13].

В настоящее время существует множество успешных технологий сушки конкретных штаммов, но при этом единые рекомендации по лиофилизации вирусов с различной ультраструктурой вирионов не разработаны [7, 19, 24]. Так, для лиофилизации коронавируса и вирусов парагриппа крупного рогатого скота (КРС) и плотоядных, вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней наиболее эффективной была среда на основе питательной среды с добавлением 3% эмбриональной сыворотки КРС, 2,5% желатина и 3,5% сахарозы [18, 19]. Для лиофилизации респираторно-синцитиального вируса рекомендовано использование среды на основе фосфатного буфера с 0,2 М сахарозы, 0,005 М глутамата натрия и 1% бычьего альбумина [11, 26]. При исследовании стабильности живой аттенуированной вакцины против чумы мелких жвачных животных, лиофилизированной с различными наполнителями, наибольший защитный эффект обеспечивала композиция гидролизата лактальбумина (5%) и сахарозы (10%) [24]. Для лиофилизации живых вакцин против кори, паротита и краснухи используют среду на основе фосфатного буфера с добавлением сахарозы, глутамата натрия и человеческого альбумина [18, 20]. При лиофилизации вируса гриппа (штамм PR8) в качестве стабилизирующих веществ используют лактобионат кальция и сывороточный альбумин человека в физиологическом растворе с конечной концентрацией каждого вещества 1%. Было установлено, что для данного штамма оптимальное значение остаточной влажности – 1,6% [13]. Результаты работы с международными коллекциями вирусов свидетельствуют о более высокой сохранности лиофилизированных вирусов во время хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$ , чем при  $4^{\circ}\text{C}$  [2, 7, 12, 21, 23, 27].

Представляет интерес исследование по хранению вируса *La Sota*, высушенного с применением

оптимальных значений этого показателя для вирусов равных 1–3% [1, 9, 15].

Сейчас существуют многочисленные успешные технологии для сушки конкретных штаммов, но нет общих рекомендаций по лиофилизации вирусов с различной ультраструктурой вирионов [1, 16, 22]. В частности, лиофилизация коронавируса и парагриппа вирусов крупного рогатого скота и свиней, возбудителя гастроэнтерита была успешной при использовании среды на основе культуры, дополненной 3% сыворотки телят, 2,5% желатина и 3,5% сахарозы [14, 16]. Для лиофилизации респираторно-синцитиального вируса, среда на основе фосфатного буфера с 0,2 М сахарозы, 0,005 М натрия глутамата и 1% бовиного альбумина была полезна [7, 26]. При исследовании стабильности живой аттенуированной вакцины против чумы мелких жвачных животных, лиофилизированной с различными добавками, состав гидролизата лактальбумина (5%) и сахарозы (10%) обеспечил наибольшую защитную эффективность [22]. Для лиофилизации живых вакцин против кори, паротита и краснухи, среда на основе фосфатного буфера с сахарозой, натрием глутаматом и человеческим альбумином была использована [14, 17]. При лиофилизации вируса гриппа (штамм PR8), кальций лактобионат и человеческий сывороточный альбумин использовались в физиологическом растворе в конечной концентрации 1% каждого вещества. Было установлено, что для этого штамма оптимальное значение остаточной влажности было 1,6% [9]. Результаты исследований, проведенных на международных коллекциях вирусов, указывают на лучшее сохранение лиофилизированных вирусов при  $-20^{\circ}\text{C}$  по сравнению с  $4^{\circ}\text{C}$  [1, 4, 8, 18, 21, 27].

Интересно исследовать хранение вируса *La Sota*, лиофилизированного методом ВФД (вакуумная сушка пены). Вирус был введен в защитную среду, состоящую из фосфатного буфера, содержащего сахарозу или трегалозу в различных концентрациях, с добавлением N-З-амина, фруктозы, галактозы, поливинилпирролидона, PEG-6000 в различных комбинациях. Образцы вспенивались в сушильной камере под вакуумом, лиофилизировались и хранились при температурах 5, 25,  $40^{\circ}\text{C}$ . Лучших результатов по сохранению вируса достигли при сушке в смеси сахарозы, N-З-амина и поливинилпирролидона. Инфекционный вирусный титр сохранялся в течение 21 дня (наблюдение) при  $5^{\circ}\text{C}$  во всех образцах, а при более высоких температурах в некоторых образцах он снижался. После хранения в течение 21 дня при  $40^{\circ}\text{C}$  в четырех из шести образцов вирус был полностью инактивирован [19].

Многие факторы влияют на жизнеспособность вирусов во время заморозки и дальнейшего хранения при низких температурах: состав, осмотическое давление и pH консервирующей среды, скорость охлаждения, температура и время хранения, скорость разморозки [7, 14]. При лиофилизации наиболее оптимальным начальным значением pH защитной среды является



метода VFD (vacuum foam drying). Вирус вносили в защитные среды на основе калий-фосфатного буфера, содержащего в разных концентрациях сахарозу или трегалозу с добавлением в различных комбинациях N-Z-амин, фруктозы, галактозы, поливинилпирролидона, ПЭГ-6000. Образцы вспенивали в камере сушки под вакуумом, лиофилизировали и хранили при температурах 5, 25, 40°C. Наиболее высокие результаты сохранности вируса обеспечивало высушивание в смесях сахарозы, N-Z-амин и поливинилпирролидона. Инфекционный титр вируса сохранялся в течение 21 суток (срок наблюдения) при 5°C во всех образцах, а при более высоких температурах в ряде образцов снижался. После хранения в течение 21 суток при 40°C в четырех из шести образцах вирус полностью инактивировался [22].

Установлено большое число факторов, которые могут влиять на жизнеспособность вирусов в процессе замораживания и дальнейшего хранения при низких температурах: состав, осмолярность и pH консервирующей среды, скорость охлаждения, температура и длительность хранения, скорость оттаивания [11, 18]. Исходное значение pH защитной среды в пределах от 7,0 до 8,0 также, как и при лиофилизации, является оптимальным для хранения вирусов в замороженном состоянии [12, 14, 27]. Особое значение при подборе защитных сред для хранения вирусов имеет их катионный состав. Например, присутствие  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  при добавлении фосфатно-солевого буфера в среду обеспечивает лучшую сохранность некоторых вирусов [11, 18].

Сохранение инфекционной активности сложных вирусов при хранении в замороженном состоянии в большой степени зависит от целостности суперкапсида вириона, состоящего из компонентов цитоплазматической мембраны вирусинфицированной клетки. Это дало основания для использования при замораживании сложных вирусов защитных веществ, применяемых для криоконсервирования клеток эукариот, в частности диметилсульфоксида (ДМСО) [15, 18, 24, 27]. Эффективность ДМСО сравнивали с эффективностью эмбриональной сыворотки КРС в ходе хранения вирусов кори, ветряночного стоматита и вируса Синдбис при -40°C. Результаты этих исследований показали, что и эмбриональная сыворотка КРС в концентрации 20% (по объему), и ДМСО в концентрациях 5–20% оказывали выраженный протективный эффект. Предположительно, это связано со способностью ДМСО стабилизировать липопротеиновый комплекс вирусных частиц [28]. Показана эффективность применения данного вещества также для хранения вирусов гриппа и кори при -65°C [14].

store the viruses in a frozen state was within the range from 7.0 to 8.0 [8, 10, 27]. Of a particular importance for the proper selection of protective media for the storage of viruses is their cationic composition. For example, the presence of  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  in the medium provides better preservation of some viruses [7, 14].

Preservation of an infectious activity of the complex viruses during storage in a frozen state depends to a large extent on an integrity of virion supercapsid consisting of the components of cytoplasmic membrane of the virus-infected cell. This allowed application of protective substances used for cryopreservation of eukaryotic cells, in particular dimethylsulfoxide (DMSO), for freezing of complex viruses [11, 14, 22, 27]. For example, the efficiency of DMSO was compared with effect of fetal bovine serum during storage of measles virus, vesicular stomatitis and Sindbis virus at -40°C. The results of these studies revealed that both fetal bovine serum at 20% concentration (v/v), and DMSO under concentrations of 5–20% had a pronounced protective effect. Presumably, this is due to the ability of DMSO to stabilize the lipoprotein complex of viral particles [28]. The effectiveness of this substance application was also demonstrated during the storage of the influenza and measles viruses at -65 °C [10].

To store the viruses at temperatures of 4 and -20°C, glycerol is widely used in concentrations of 2–50% (most often 10%). Nevertheless, glycerol can be toxic for some viruses (Table) [14]. Human serum albumin demonstrated a more pronounced protective effect than DMSO for freezing the Newcastle disease virus down to -65°C [10, 14]. Freezing and subsequent storage of most viruses were successful when sucrose and trehalose were applied under various concentrations (mostly 10%), as well as the serum albumin at the concentrations ranged from 0.1 to 4% and inactivated blood serum of various vertebrates at concentrations from 10 to 20% [14]. Preservation of infectious titers of the respiratory syncytial virus frozen down to -86°C was observed when using the growth media, supplemented with the following protective substances: 0.5% gelatin and 0.3 M sodium glutamate (6 months follow-up period); 3.5% DMSO (2 years follow-up period); 45% fetal bovine serum or 40% glycerol, or sugars (25% sucrose, 10% trehalose and 10% sorbitol) (3 years follow-up period) [11]. Phosphate buffer medium with 0.2 M sucrose, as well as a growth medium containing 2% fetal bovine serum were effective when the respiratory syncytial virus was stored at -70°C [12, 24]. Glucose and albumin were recommended as the stabilizing agents for storage of the influenza virus types A and B at -70°C [2, 6]. In addition to the above substances, polyethylene oxide, glucose, dextran, polyvinylpyrrolidone, ammonium



Концентрации стабилизирующих веществ, которые наиболее часто используются для лиофилизации и замораживания вирусов  
Concentrations of stabilizing substances, most often used for freeze-drying and freezing of viruses

Стабилизирующие вещества Stabilizing substances	Концентрация для лиофилизации, % Concentrations for freeze-drying, %	Концентрация для замораживания, % Concentrations for freezing, %
Желатин Gelatin	2,5	0,5
Сахароза Sucrose	0,1–10	0,1–25
Глутамат натрия Sodium glutamate	0,001	0,05
Эмбриональная сыворотка крови животных Fetal serum of vertebrates	3	2–45
Сывороточный альбумин Serum albumin	1	0,1–4
Гидролизат лактальбумина Hydrolyzate of lactalbumin	5	–
Сорбитол Sorbitol	–	10
Лактобионат кальция Calcium lactobionate	1	–
ДМСО DMSO	–	3,5–20
Глицерин Glycerol	–	2–50
Трегалоза Trehalose	–	10

Для хранения вирусов при температурах 4 и  $-20^{\circ}\text{C}$  широко применяют глицерин в концентрациях 2–50% (наиболее часто – 10%). Однако глицерин может быть токсичным для некоторых вирусов [18]. Сывороточный альбумин человека показал более выраженный защитный эффект, чем ДМСО при замораживании вируса болезни Ньюкасла до  $-65^{\circ}\text{C}$  [14, 18]. Для замораживания и последующего хранения большинства вирусов используют сахарозу и трегалозу в различных концентрациях (наиболее часто 10%), сывороточный альбумин в концентрациях от 0,1 до 4%, инактивированную сыворотку крови различных позвоночных животных в концентрациях от 10 до 20% (таблица) [18]. Сохранность инфекционных титров респираторно-синцитиального вируса, замороженного до  $-86^{\circ}\text{C}$ , наблюдали в ростовых средах с добавлением следующих защитных веществ: 0,5% желатина и 0,3М глутамата натрия (срок наблюдения – 6 месяцев); 3,5% ДМСО (срок наблюдения – 2 года); 45% эмбриональной сыворотки КРС или 40% глицерина, или сахаров (25% сахарозы, 10% трегалозы и 10% сорбитола) (срок наблюдения – 3 года) [15]. При хранении респираторно-синцитиального вируса при  $-70^{\circ}\text{C}$  эффективным было использование среды на основе фосфатного буфера с 0,2 М сахарозы, а также ростовой среды, содер-

acetate, citrate, peptone, skimmed milk, sodium glutamate were also used to improve the preservation of viruses in a frozen state [12–14, 27, 28].

Studies aimed to preserve the viruses at various low temperatures have shown that during storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ , a rapid inactivation of viruses occurs. It is effective to store the specimens, containing live viruses at the temperatures below  $-60^{\circ}\text{C}$  [8, 10, 27]. The most effective was to store the viruses at liquid nitrogen temperature, however, this method was not always applicable due to the lack of the equipment needed [1, 8, 10, 27]. Glycerol or DMSO are often used for cryopreservation in combination with fetal bovine serum [1]. The storage of viruses is mostly performed at temperatures from  $-60$  down to  $-85^{\circ}\text{C}$ , since commercial freezers are usually suitable for keeping these temperatures, which enable the storage of virus-containing specimens in a large volume necessary for the further production of immunobiological preparations [1, 8, 10, 12, 27]. The effectiveness of these temperature regimens was evidenced by the outcome of storage of the influenza type B virus. The virus was stored at room temperature and at 4,  $-20$ ,  $-70^{\circ}\text{C}$  in Hanks solution supplemented with the albumin and HEPES buffer. After 17 weeks the virus with the original infectious titer was preser-



жащей 2% эмбриональной сыворотки КРС [6, 16]. В качестве стабилизаторов для хранения вируса гриппа типов А и В при  $-70^{\circ}\text{C}$  рекомендованы глюкоза и альбумин [8, 10]. Помимо вышеперечисленных веществ с целью улучшения сохранности вирусов в замороженном состоянии используют также полиэтиленоксид, глюкозу, декстран, поливинилпирролидон, ацетат аммония, цитрат, пептон, обезжиренное молоко, глутамат натрия [16–18, 27, 28].

Исследования сохранности вирусов при различных низких температурах показали, что в процессе хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$  происходит быстрая инактивация вирусов. Эффективно хранение материала, содержащего живые вирусы, при температурах ниже  $-60^{\circ}\text{C}$  [12, 14, 27]. Наиболее эффективно хранение вирусов при температуре жидкого азота, однако данный метод не всегда применим из-за отсутствия необходимого оборудования [7, 12, 14, 27]. Для криоконсервирования используют глицерин или ДМСО в комбинации с эмбриональной сывороткой КРС [7]. Наибольшее распространение получило хранение вирусов при температурах от  $-60$  до  $-85^{\circ}\text{C}$ , поскольку технически для соблюдения данных температур пригодны коммерческие морозильные камеры, которые позволяют хранить вирусосодержащий материал в большом объеме, необходимым для дальнейшего производства иммунологических препаратов [7, 12, 14, 16, 27]. Об эффективности указанных температурных режимов хранения свидетельствуют результаты исследований по хранению вируса гриппа типа В. Вирус хранили при комнатной температуре и температурах  $4$ ,  $-20$ ,  $-70^{\circ}\text{C}$  в солевом растворе Хенкса с добавлением альбумина и буфера NEPES. Через 17 недель вирус с исходным инфекционным титром сохранился только при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . При более высоких температурах он инактивировался [10]. При заборе и транспортировке вирусосодержащих материалов рекомендуют использовать защитные среды на основе питательного бульона с добавлением сахаразы и хранение при температуре сухого льда [18].

Согласно рекомендациям ВОЗ для хранения производственных штаммов вируса бешенства в замороженном состоянии предпочтительно использовать температуры ниже  $-60^{\circ}\text{C}$  [29]. Так, для производства антирабических вакцин рекомендовано хранение вируса бешенства, штамма PM, при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ , штамма Flury-LEP – при  $-80$  и  $-196^{\circ}\text{C}$ , суспензии контрольного штамма вируса бешенства CVS-11 – от  $-60$  до  $-80^{\circ}\text{C}$ . Использовали консервирующие составы на основе культуральных сред [21, 23]. Более высокие показатели сохранности вакцинных штаммов вируса бешенства *L. Pasteur* и CVS в течение года отмечены при  $-80^{\circ}\text{C}$  по сравнению с хранением при  $-20^{\circ}\text{C}$ . В качестве среды консервирования использовали

ved only at a temperature of  $-70^{\circ}\text{C}$ , and higher temperatures resulted in its full inactivation [6]. During the collection and transportation of virus containing materials, it is recommended to use protective media based on nutrition broth, supplemented with sucrose, and dry ice temperature storage [14].

According to the WHO recommendations, it is preferable to use the temperatures below  $-60^{\circ}\text{C}$  [29] to store the industrial strains of the rabies virus in a frozen state. In particular, the production of anti-rabies vaccines should involve the storage of the rabies virus, PM strain, at  $-70^{\circ}\text{C}$ , Flury-LEP strain at  $-80$  and  $-196^{\circ}\text{C}$ , and suspension of the control strain of rabies virus, CVS-11, from  $-60$  down to  $-80^{\circ}\text{C}$ . Preservative compositions based on culture media were used in all these cases [18, 21]. Higher survival of vaccine strains of the rabies virus *L. Pasteur* and CVS within the year of storage were found at  $-80^{\circ}\text{C}$  in comparison with  $-20^{\circ}\text{C}$ , the DMEM culture medium supplemented with 0.2% serum albumin and 5% sucrose was used as a preservation medium (Figure [4]). The storage of rabies virus vaccine strains of the Schelkovo-51 K rabies virus and RB-71 at  $-18^{\circ}\text{C}$  in the growth medium supplemented with fetal bovine serum provided the preservation of infectious activity just for 6 months [20].

Most RNA viruses are pathogenic [15] and in all the recommendations for handling the collections and operational banks of viruses it is indicated that the design of cryovials and containers for storing the viruses at low temperatures should minimize the infection of the environment and personnel [1, 14, 27].

Thus, long-term storage of viruses could be performed using freeze-drying followed by storage either at sub-zero or moderately-low temperatures or freezing down to low temperatures. To prevent the adverse effects of physico-chemical damaging factors during freezing and drying the viruses, stabilizing substances of various nature should be used. There is no single optimal protocol for a long-term storage of viruses, which is probably due to differences in their ultrastructure [15]. In this regard, it is necessary to develop specific methods for a long-term storage of different strains and types of viruses.

## References

1. ATCC Virology guide. Tips and techniques for propagating virus in tissue culture and embryonated chicken eggs. Manassas: ATCC; 2016.
2. Bean B., Moore B.M., Sterner B. et al. Survival of influenza viruses on environmental surfaces. *Journal of Infectious Diseases* 1982; 146(1): 47–51.
3. Brovarnik V.V., Golovach T.M. Information support of the microorganisms cultures depository. *Control systems and machines* 2015; (4): 58–66.



культуральную среду ДМЕМ с добавлением 0,2% сывороточного альбумина и 5% сахарозы (рисунк) [2]. Хранение вакцинных штаммов вируса бешенства Щелково-51 К и РБ-71 при  $-18^{\circ}\text{C}$  в ростовой среде с добавлением эмбриональной сыворотки КРС обеспечивало сохранность инфекционной активности только в течение 6 месяцев [4].

Большинство РНК-содержащих вирусов являются патогенными [3], и во всех рекомендациях по обеспечению работы с коллекциями и производственными банками вирусов указывается, что конструкция криобирок и контейнеров для хранения вирусов при низких температурах должна максимально снижать вероятность инфицирования окружающей среды и персонала [7, 18, 27].

Таким образом, для долгосрочного хранения вирусов можно использовать метод лиофилизации с последующим хранением при субнулевых или умеренно низких температурах и замораживание до низких температур. Для предотвращения неблагоприятного воздействия физико-химических повреждающих факторов при замораживании и высушивании вирусов следует применять стабилизирующие вещества различной природы. Не существует единого оптимального протокола долгосрочного хранения вирусов, что, вероятно, объясняется различиями их ультраструктуры [3]. В этой связи необходима разработка методик долгосрочного хранения разных штаммов и видов вирусов.

## Литература

1. Броварник В.В., Головач Т.М. Інформаційний супровід депозитарію культур мікроорганізмів // Управляючі системи і машини. – 2015. – №4. – С. 58–66.
2. Буркова В.В., Высеканцев И.П., Лаврик А.А. Сохранность инфекционной активности промышленных штаммов вируса бешенства, хранившихся при различных температурах // Электронное периодическое издание ЮФУ «Живые и биокосные системы». – 2014. – №9. [электронный ресурс]: <http://www.jbks.ru/archive/issue-9/article> – 23.
3. Львов Д.К., Алимбарова Л.М., Альховский С.В. и др. Медицинская вирусология. – М.: МИА, 2008. – 656 с.
4. Полупан І.М. Оцінка різних методів зберігання вакцинних штамів вірусу сказу // Ветеринарна біотехнологія. – 2011. – №20. – С. 127–133.
5. Стегний М.Ю. Свойства вирусов крупного рогатого скота, консервированных при умеренно низких температурах // Проблемы криобиологии. – 2003. – №3. – С. 88–91.
6. Строганова И. Я. Инфекционная активность респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота в процессе хранения // Вестник Краснояр. гос. аграр. ун-та. – 2009. – №12. – С. 155–157.
7. ATCC Virology guide. Tips and techniques for propagating virus in tissue culture and embryonated chicken eggs. – Manassas: ATCC, 2016. – 32 p.
8. Bean B., Moore B.M., Sterner B. et al. Survival of influenza viruses on environmental surfaces // Journal of Infectious Diseases. – 1982. – Vol. 146, №1. – P. 47–51.
4. Burkova V.V., Visekantsev I.P., Lavrik A.A. Preservation of infectious activity of rabies virus industrial strains stored at various temperatures. Electronic periodical publication of SFU 'Live and bioconcent systems'. – 2014; (9). [Electronic resource]: <http://www.jbks.ru/archive/issue-9/article> – 23.
5. Carpenter J.F., Izutsu K., Randolph T.W. Freezing- and drying-induced perturbations of protein structure and mechanisms of protein protection by stabilizing additives. In: L. Rey, J.C. May, editors. Freeze Drying/Lyophilisation of Pharmaceutical and Biological Products. 3<sup>d</sup> ed. London: Informa Healthcare; 2010: 167–197.
6. Chaniot S.C.M., Holmes M.J., Stott E.J., Tyrrell D.A.J. An investigation of media for the long term storage of three respiratory viruses. Arch Virol 1974; 44(4): 396–400.
7. Fernie B.F., Gerin J.L. The stabilization and purification of respiratory syncytial virus using  $\text{MgSO}_4$ . Virology 1980; 106(1): 141–144.
8. Gould E.A. Methods for long-term virus preservation. Mol Biotechnol 1999; 13(1): 57–66.
9. Greiff D. Stabilities of suspensions of influenza virus dried by sublimation of ice in vacuo to different contents of residual moisture and sealed under different gases. Appl Microbiol 1970; 20(6): 935–938.
10. Greiff D., Rightsel W. A. Stabilities of suspensions of viruses after freezing or drying by vacuum sublimation and storage. Cryobiology 1967; 3(6): 432–444.
11. Gupta C.K., Leszczynski J., Gupta R.K., Siber G.R. 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; 18(15): 1417–1420.
12. Howell C.L., Miller M.J. Effect of sucrose phosphate and sorbitol on infectivity of enveloped viruses during storage. J Clin Microbiol 1983; 18(3): 658–662.
13. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology 2003; 46(3): 205–229.
14. Johnson F.B. Transport of viral specimens. Clinical Microbiology Reviews 1990; 3(2): 120–131.
15. Lvov D.K., Alimbarova L.M., Alkhovsky S.V. et al. Medical virology. Moscow: MIA; 2008.
16. Malenovska H. The influence of stabilizers and rates of freezing on preserving of structurally different animal viruses during lyophilization and subsequent storage. J Applied Microbiol 2014; 117(6): 1810–1819.
17. McAleer W.J., Markus H.Z., McLean A. A. et al. Stability on storage at various temperatures of live measles, mumps and rubella virus vaccines in new stabilizer. Journal Biological Standardization 1980; 8(4): 281–287.
18. Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. Geneva: World Health Organization; 1996.
19. Pisal S., Wawde G., Salvankar S. et al. Vacuum foam drying for preservation of LaSota virus: effect of additives. AAPS PharmSciTech 2006; 7(3): E30–E37.
20. Polupan I.M. Estimation of different storage methods of rabies virus vaccine strains. Veterinary Biotechnology 2011; (20): 127–133.
21. Rabies. In: OIE terrestrial manual. Paris: World Organisation for Animal Health; 2013. p. 1–28.
22. Sarkar J., Sreenivasa B.P., Singh R.P. et al. Comparative efficacy of various chemical stabilizers on the thermostability of a live-attenuated peste des petits ruminants (PPR) vaccine. Vaccine 2003; 21(32): 4728–4735.
23. Stegnyy M.Yu. Properties of cattle viruses, preserved at moderately low temperatures. Probl Cryobiol 2003; (3): 88–91.
24. Stroganova I.Ya. Infectious activity of cattle respiratory syncytial virus during storage. Bulletin of Krasnoyarsk State Agrarian University 2009; (12): 155–157.
25. Tanaka T., Takeda T., Miyajama R. Cryoprotective effect of saccharides on denaturation of catalase during freeze-drying. Chem Pharm Bull 1991; 675(5): 1091–1094.
26. Tannock G.A., Hierholzer J.C., Bryce D.A. et al. Freeze-drying of respiratory syncytial viruses for transportation and storage. J Clin Microbiol 1987; 25(9): 1769–1771.





9. Carpenter J.F., Izutsu K., Randolph T.W. Freezing- and drying-induced perturbations of protein structure and mechanisms of protein protection by stabilizing additives // *Freeze Drying/ Lyophilisation of Pharmaceutical and Biological Products* / Ed. by L. Rey, J. C. May. 3<sup>d</sup> ed. – London: Informa Healthcare, 2010. – P. 167–197.
10. Chaniot S.C.M., Holmes M.J., Stott E.J., Tyrrell D.A.J. An investigation of media for the long term storage of three respiratory viruses // *Archives of Virology*. – 1974. – Vol. 44, №4. – P. 396–400.
11. Fernie B.F., Gerin J.L. The stabilization and purification of respiratory syncytial virus using MgSO<sub>4</sub> // *Virology*. – 1980. – Vol. 106, №1. – P. 141–144.
12. Gould E.A. Methods for long-term virus preservation // *Molecular biotechnology*. – 1999. – Vol. 13, №1. – P. 57–66.
13. Greiff D. Stabilities of suspensions of influenza virus dried by sublimation of ice in vacuo to different contents of residual moisture and sealed under different gases // *Applied microbiology*. – 1970. – Vol. 20, №6. – P. 935–938.
14. Greiff D., Rightsel W.A. Stabilities of suspensions of viruses after freezing or drying by vacuum sublimation and storage // *Cryobiology*. – 1967. – Vol. 3, №6. – P. 432–444.
15. Gupta C.K., Leszczynski J., Gupta R.K., Siber G.R. 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. – Vol. 18, №15. – P. 1417–1420.
16. Howell C.L., Miller M.J. Effect of sucrose phosphate and sorbitol on infectivity of enveloped viruses during storage // *Journal of clinical microbiology*. – 1983. – Vol. 18, №3. – P. 658–662.
17. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // *Cryobiology*. – 2003. – Vol. 46, №3. – P. 205–229.
18. Johnson F. B. Transport of viral specimens // *Clinical Microbiology Reviews*. – 1990. – Vol. 3, №2. – P. 120–131.
19. Malenovska H. The influence of stabilizers and rates of freezing on preserving of structurally different animal viruses during lyophilization and subsequent storage // *Journal of applied microbiology*. – 2014. – Vol. 117, №6. – P. 1810–1819.
20. McAleer W.J., Markus H.Z., McLean A.A. et al. Stability on storage at various temperatures of live measles, mumps and rubella virus vaccines in new stabilizer // *Journal of Biological Standardization*. – 1980. – Vol. 8, №4. – P. 281–287.
21. Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H. Laboratory techniques in rabies – Geneva: World Health Organization, 1996. – 446 p.
22. Pisal S., Wawde G., Salvankar S. et al. Vacuum foam drying for preservation of LaSota virus: effect of additives // *AAPS PharmSciTech*. – 2006. – Vol. 7, №3. – P. E30–E37.
23. Rabies // OIE terrestrial manual. – Paris: World Organisation for Animal Health, 2013. – Ch. 2.1.13. – P. 1–28.
24. Sarkar J., Sreenivasa B.P., Singh R.P. et al. Comparative efficacy of various chemical stabilizers on the thermostability of a live-attenuated peste des petits ruminants (PPR) vaccine // *Vaccine*. – 2003. – Vol. 21, №32. – P. 4728–4735.
25. Tanaka T., Takeda T., Miyajama R. Cryoprotective effect of saccharides on denaturation of catalase during freeze-drying // *Chem. Pharm. Bull.* – 1991. – Vol. 675, №5. – P. 1091–1094.
26. Tannock G.A., Hierholzer J.C., Bryce D.A. et al. Freeze-drying of respiratory syncytial viruses for transportation and storage // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1987. – Vol. 25, №9. – P. 1769–1771.
27. Tedeschi R., De Paoli P. Collection and preservation of frozen microorganisms // *Methods in molecular biology*. – 2011. – Vol. 675. – P. 313–326.
28. Wallis C., Melnick J.L. Stabilization of enveloped viruses by dimethyl sulfoxide // *Journal of virology*. – 1968. – Vol. 2, №9. – P. 953–954.
29. World Health Organization. Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs // WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-sixth report. – Geneva: World Health Organization, 2007. – P. 83–132.