

## Активность штамма вируса бешенства CVS (20%-я мозговая суспензия) после хранения при разных температурах

В.В. Буркова<sup>1,2</sup>, А.А. Лаврик<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>ПАО «Фармстандарт-Биолек», г. Харьков

## Activity of Rabies Virus Strain CVS (20% Cerebral Suspension) After Storage at Different Temperatures

V.V. Burkova<sup>1,2</sup>, A.A. Lavrik<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Pharmstandard-Biolek PJSC, Kharkov, Ukraine

Для проверки иммуногенности инактивированной антирабической вакцины ВОЗ рекомендует использовать NIH-test (National Institutes of Health Test) [Wilbur L.A. и соавт., 1996]. Активность антирабического иммуноглобулина определяли с помощью MNT (Mouse Neutralization Test – реакция нейтрализации) [Fitzgerald E.A., 1996]. В данных реакциях используют аттенуированный штамм вируса бешенства CVS, пассированный в мозге мышей. В предыдущих исследованиях нами показано, что в ходе хранения аттенуированных культуральных штаммов вируса бешенства при низких температурах их активность снижается [Буркова В.В. и соавт., 2014].

Цель данного исследования – изучить активность контрольного штамма вируса бешенства CVS (20%-я мозговая суспензия) после хранения при температуре  $-20$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Вирус получали путем пассирования в мозговой ткани белых лабораторных мышей. Вирусную суспензию фасовали в криопробирки и замораживали при  $-20$  и  $-80^{\circ}\text{C}$ . Инфекционную активность исследовали после хранения образцов в течение 2 недель, 1, 3 и 6 месяцев. После низкотемпературного хранения мозговую суспензию размораживали и готовили серийные разведения. Изменение вирулентности определено при интрацеребральном заражении лабораторных мышей после титрации. Таким образом были смоделированы условия постановки MNT и NIH-test. В качестве контроля использовали данные по активности вирусной суспензии до замораживания. При моделировании условий постановки MNT приготовленные вирусные разведения инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 100 мин и затем вводили в мозг животных. Титр вируса рассчитывали с помощью формулы Спирмена-Карбера и выражали в  $IgLD50$  [Fitzgerald E.A., 1996; Wilbur L.A. и соавт., 1996].

Через 6 месяцев хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$  инфекционная активность вируса снизилась с  $(7,75 \pm 0,15)$  до  $(5,47 \pm 0,12) IgLD50$ , и до  $(6,18 \pm 0,15) IgLD50$  – после хранения при  $-80^{\circ}\text{C}$ . После моделирования условий постановки MNT активность вируса значимо снижалась по сравнению с образцом, поставленным в тест сразу после размораживания, на  $(15,57 \pm 3,31)\%$ .

Результаты данного исследования свидетельствуют о снижении активности суспензии контрольного штамма вируса бешенства CVS после хранения при низких температурах ( $-20$  и  $-80^{\circ}\text{C}$ ) и последующего инкубирования при  $37^{\circ}\text{C}$ . Полученные результаты подтверждают необходимость разработки коэффициента снижения вирулентности с целью пересчета заражающей дозы при постановке контрольных исследований активности антирабических препаратов.

NIH-test (National Institutes of Health Test) is recommended by WHO to examine immunogenicity of an inactivated rabies vaccine [Wilbur L.A. *et al.*, 1996]. Activity of rabies immunoglobulin was determined by MNT (Mouse Neutralization Test) [Fitzgerald E.A., 1996]. In these reactions an attenuated strain of rabies virus CVS, passaged in murine brain is used. In previous studies we have shown that during storage of attenuated culture strains of rabies virus at low temperatures, their activity is reduced [Burkova V.V. *et al.*, 2014].

The research aim was to study the activity of control strain of rabies virus CVS (20% cerebral suspension) after storage at  $-20$  and  $-80^{\circ}\text{C}$ .

The virus was obtained by passaging in brain tissue of white laboratory mice. The viral suspension was packed into cryovials and frozen at  $-20$  and  $-80^{\circ}\text{C}$ . Infectious activity was assayed in the samples after storage for 2 weeks, 1, 3 and 6 months. After low-temperature storage cerebral suspension was frozen-thawed and serial dilutions were prepared. Virulence change was determined at intracerebral infection of laboratory mice after titration. Thus, the conditions of MNT and NIH-test setting were simulated. The data on activity of viral suspension prior to freezing were the control. During MNT simulation the prepared viral dilutions were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 100 minutes and then injected into animal brain. The virus titer was calculated using Spearman-Karber formula and expressed in  $IgLD50$  [Fitzgerald E.A., 1996; Wilbur L.A. *et al.*, 1996].

After 6 months of storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  infectious virus activity decreased from  $(7.75 \pm 0.15)$  down to  $(5.47 \pm 0.12) IgLD50$ , and after storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  it reduced down to  $(6.18 \pm 0.15) IgLD50$ . After MNT simulation virus activity was significantly reduced if compared with the sample tested immediately after thawing by  $(15.57 \pm 3.31)\%$ .

The results of this study testify to a reduction of activity in suspension of control strain of rabies virus CVS after storage at low temperatures ( $-20$  and  $-80^{\circ}\text{C}$ ) and the following incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ . These results confirm the necessity to develop a coefficient of virulence reduction in order to recalculate the infection dose in control tests of rabies preparations activity.

