

UDC 57.043:57.086.132:578.22:578.72:578.824.11

V.V. Варяница^{1,2*}, И.П. Высеканцев¹

Инфекционная активность лиофилизированного в различных защитных средах вакцинного штамма вируса бешенства L. Pasteur после его последующего хранения при разных температурах

UDC 57.043:57.086.132:578.22:578.72:578.824.11

V.V. Varyantsia^{1,2*}, I.P. Vysekantsev¹

Infectious Activity of L. Pasteur Rabies Virus Vaccine Strain Frozen-Dried in Various Protective Media and Then Stored at Various Temperatures

Реферат: В работе исследовали сохранность производственного вакцинного штамма вируса бешенства L. Pasteur после лиофилизации в различных защитных средах и последующего хранения при температурах 5, –20 и –80°C. После хранения в течение 24 месяцев (срок наблюдения) наиболее высокие показатели инфекционной активности вируса во всех средах были отмечены при температуре –80°C. Максимальную сохранность вируса обеспечивала защитная среда на основе питательной среды DMEM с добавлением 0,5% бычьего сывороточного альбумина, 1% желатина и 5% сахарозы. Инфекционная активность образцов, лиофилизированных в средах, содержащих 5% сахарозы или 3% желатина и 5% сахарозы, или 10% сахарозы, была значимо ниже. Установлено, что добавление 3% желатина в защитную среду значительно увеличивает время растворения препаратов по сравнению с другими средами и нормой регламента (не более минуты), что затрудняет их практическое использование. Время растворения образцов с 1% желатина и 5% сахарозы или 10% сахарозы было значимо больше, чем препаратов с 5% сахарозы, но соответствовало производственному регламенту. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости подбора индивидуальных режимов сушки при лиофилизации вирусов в защитных средах с различным составом.

Ключевые слова: вирус бешенства, лиофилизация, культура клеток, защитные среды, долгосрочное хранение, сохранность вируса, инфекционная активность вируса.

Реферат: У роботі досліджували збереженість виробничого вакцинного штаму вірусу сказу L. Pasteur після ліофілізації в різних захисних середовищах та наступного зберігання за температур 5, –20 і –80°C. Після зберігання протягом 24 місяців (термін спостереження) найбільш високі показники інфекційної активності вірусу в усіх середовищах були відзначені за температури –80°C. Максимальну збереженість вірусу забезпечувало захисне середовище на основі живильного середовища DMEM із додаванням 0,5% бичачого сироваткового альбуміну, 1% желатину та 5% сахарози. Інфекційна активність зразків, ліофілізованих у середовищах, які містять 5% сахарози або 3% желатину і 5% сахарози, або 10% сахарози, була значуще нижчою. Встановлено, що додавання 3% желатину в захисне середовище значно збільшує час розчинення препаратів у порівнянні з іншими середовищами і нормою регламенту (не більше хвилини), що ускладнює їх практичне використання. Час розчинення зразків з 1% желатину і 5% сахарози або 10% сахарози був значуще більше, ніж препаратів з 5% сахарози, але відповідав виробничому регламенту. Отримані результати свідчать про необхідність підбору індивідуальних режимів сушки при ліофілізації вірусів у захисних середовищах з різним складом.

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

Abstract: In this research, we studied the survival of industrial L. Pasteur rabies virus vaccine strain after freeze-drying in various protective media and further storage at 5, –20 and –80°C. After 24-month storage (the observation period), the highest rates of the virus infectious activity were found after storage at –80°C in all the media. The maximum virus survival was found in the DMEM-based protective medium, supplemented with 0.5% bovine serum albumin, 1% gelatin and 5% sucrose. The infectious activity of the specimens, frozen-dried in the media, containing either 5% sucrose or 3% gelatin and 5% sucrose, or 10% sucrose was significantly lower. The supplement of 3% gelatin to a protective medium was established to significantly increase the time of preparations dissolution as compared to other media and the regulation standard (*i. e.*, not more than 1 min), that could complicate their practical use. The time of specimens' dissolution with 1% gelatin and 5% sucrose or 10% sucrose was significantly longer if comparing to those with 5% sucrose, but complied with the production regulations. The obtained results indicate the need to select individual modes selection of drying for the viruses freeze-drying in protective media with different composition.

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

¹Відділ кріомікробіології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків
²ПАТ «Фармстандарт-Біолік», м. Харків

¹Department of Cryomicrobiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
²PJSC Pharmastandard-Biolik, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: vvvaryanitsa@biolik.com.ua

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: vvvaryanitsa@biolik.com.ua

Надійшла 20.03.2018

Прийнята до друку 13.11.2018

Received March, 20, 2018

Accepted November, 13, 2018

© 2018 V.V. Varyantsia et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Бешенство – зоонозная вирусная нейроинфекция, характеризующаяся развитием тяжелого энцефалита, который без применения специфической иммунотерапии заканчивается летальным исходом. Для предэкспозиционной профилактики бешенства применяют антирабические вакцины, для постэкспозиционной – антирабические вакцины и иммуноглобулины. Важную роль в предупреждении данного заболевания играет также иммунизация домашних и диких плотоядных животных [6, 15, 19]. В технологических схемах производства антирабических препаратов функционирует система банков вакцинных штаммов вируса бешенства: рабочие банки предназначены для хранения большого объема вирусной суспензии (исходное сырье), главные – долгосрочного хранения материала, которым пополняют запасы первых [2, 10, 19]. Работа таких банков и, следовательно, производство антирабических препаратов основаны на эффективных методах долгосрочного хранения вакцинных штаммов вируса бешенства [13, 18].

В фармацевтической и ветеринарной промышленности, практической медицине и коллекциях микроорганизмов для хранения вирусов широко применяют лиофилизацию [2–4, 7, 12, 14, 16, 18]. Как правило, вирусные лиофилизированные препараты хранят при 4°C, однако при данной температуре возможна потеря инфекционной активности [7, 8, 13]. Лيوфилизация разных вирусов предусматривает использование защитных сред, в состав которых входят отдельно или в различных комбинациях желатин, сахароза, глутамат натрия, сыворотка крови позвоночных или ее компоненты [2–4, 7, 9, 12, 13, 16, 18]. Поскольку унифицированные технологии лиофилизации и последующего долгосрочного хранения разных родов и штаммов вирусов не разработаны, то для этой цели применяют индивидуальные методы.

В настоящее время ПАО «Фармстандарт-Биолек» (Харьков, Украина) разрабатывает технологии производства антирабических препаратов с использованием вакцинного штамма вируса бешенства L. Pasteur, которые отвечают требованиям Всемирной организации здравоохранения [14]. Актуальной проблемой вирусологии является разработка эффективных методов долгосрочного хранения отдельных штаммов с применением защитных сред на основе культуральной поддерживающей среды, в которой накапливают вирус.

Цель работы – исследование сохранности вакцинного штамма вируса бешенства L. Pasteur после лиофилизации в различных защитных средах на основе культуральной поддерживающей

Rabies is a zoonotic viral neuroinfection, characterized by severe encephalitis development, which may be fatal if no specific immunotherapy is administered. The rabies vaccines are used for pre-exposure rabies prevention, and in case of post-exposure prophylaxis the vaccines are applied together with immunoglobulins. The immunization of domestic and wild carnivores plays an important role in preventing this disease as well [14, 16, 19]. In rabies products manufacturing protocols there is the system of banks for rabies virus vaccine strains, *i. e.* the working banks are designed to store a large amount of viral suspension (starting material), and the main ones are intended for the material long-term storage to replenish the working banks [4, 6, 19]. In order to ensure the functioning of these banks and, consequently, of entire rabies biologics production, the efficient methods for a long-term storage of rabies virus vaccine strains are needed [10, 18].

The freeze-drying is widely used in pharmaceutical and veterinary industries, practical medicine and microorganism' collections for virus storage [1, 4, 8, 9, 11–13, 18]. The frozen-dried viral preparations are usually stored at 4°C, but a loss of infectious activity during storage at this temperature is possible [1, 3, 10]. The protective media, comprising gelatin, sucrose, sodium glutamate, blood serum of vertebrates or its components either separately or in various combinations are applied for freeze-drying of different viruses [1, 4, 5, 8–10, 12, 13, 18]. Since no unified technologies for freeze-drying and further long-term storage of different genera and strains of viruses have been developed yet, the custom methods are used for this purpose.

To date, the PJSC Pharmstandard-Biolik (Kharkiv, Ukraine) has been developing the technologies for rabies biologics production, using the L. Pasteur rabies virus vaccine strain, which meet the requirements of the World Health Organization [11]. An important task in virology is to design the efficient methods for long-term storage of individual strains using the protective media, based on the culture supporting medium, where the virus is accumulated.

The aim of this research was to study the survival the L. Pasteur rabies virus vaccine strain after freeze-drying in various protective media, based on the culture supporting medium and during further storage at different temperatures.

Materials and methods

The research object was the L. Pasteur rabies virus vaccine strain, provided by the Pasteur Institute (Novi Sad, Serbia). The strain was deposited (certificate № 678) at the Depository of the State Scien-



среды и в процессе последующего хранения при разных температурных режимах.

Материалы и методы

Объектом исследования был вакцинный штамм вируса бешенства L. Pasteur, предоставленный Институтом Пастера (Нови-Сад, Сербия). Штамм задепонирован (свидетельство № 678) в Депозитарии Государственного научно-контрольного института биотехнологии и штаммов микроорганизмов (Киев, Украина).

Для накопления вируса использовали перевиваемую клеточную линию ВНК-21/С13, полученную из Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Данная культура рекомендована ВОЗ, Международным эпизоотическим бюро и другими международными организациями для получения антирабических препаратов [6, 10, 11, 14, 15, 19].

Культуру клеток сутки накапливали в пристеночном монослое в стерильных пластиковых культуральных флаконах («SPL», Германия) в ростовой среде на основе питательной среды DMEM («Biowest», Франция) с 10% фетальной бычьей сыворотки («Sigma-Aldrich», США) в условиях CO₂-инкубатора («Binder», Германия) при 37°C и 5% CO₂. Культуру клеток заражали вирусом с инфекционной активностью (5,49 ± 0,20) lg CCID₅₀ (50% cell culture infectious dose – 50%-я инфицирующая доза для культуры клеток). Контакт с вирусной суспензией длился час в условиях CO₂-инкубатора при 33°C и 5% CO₂. После этого в культуральные флаконы вносили поддерживающую среду на основе питательной среды DMEM с 0,5% бычьего сывороточного альбумина (BSA) и культивировали вирус в аналогичных условиях [1, 10, 11, 14, 15]. Вирусную суспензию собирали на 4-е сутки после заражения, очищали от клеточного детрита центрифугированием в рефрижераторной центрифуге («MPW», Польша) при 4°C (2000g, 15 мин). После отбора супернатанта в него вносили сахарозу («AppliChem», Германия) и желатин («Генезис», Украина) в следующих концентрациях (по объему): среда 1 – 5% сахарозы; среда 2 – 3% желатина и 5% сахарозы; среда 3 – 1% желатина и 5% сахарозы; среда 4 – 10% сахарозы. Все среды, кроме указанных веществ, содержали также и 0,5% BSA.

Суспензию вируса в описанных защитных средах разливали по 1 мл с помощью механического дозатора («Biohit Proline Plus», Финляндия) в стерильные стеклянные флаконы и сублимировали в лиофильной установке («VirTis», США). Затем ее лиофилизировали в условиях промышленного производства по разработанному ПАО «Фармстан-

tific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms (Kyiv, Ukraine).

The BHK-21/C13 passaged cell line, obtained from the Vertebrate Cell Culture Collection of the Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (St-Petersburg, Russia) was used for virus accumulation. This culture was recommended by the WHO, the International Epizootic Bureau and other international organizations for obtaining the rabies products [6, 7, 11, 14, 16, 19].

The cell culture was accumulated for 1 day in the near-wall monolayer in sterile plastic culture flasks (SPL, Germany) in the DMEM-based growth medium (Biowest, France) with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, USA) under CO₂ incubator conditions (Binder, Germany) at 37°C and 5% CO₂. The cell culture was infected with the virus of an infectious activity of (5.49 ± 0.20) lg CCID₅₀ (50% cell culture infectious dose). The contact with a viral suspension lasted an hour in CO₂-incubator at 33°C and 5% CO₂. Then, the supporting DMEM-based medium with 0.5% bovine serum albumin (BSA) was introduced into the culture flasks and the virus was cultured under similar conditions [2, 6, 7, 11, 14]. Viral suspension was collected to day 4 after infection, then purified from cellular debris by centrifugation in refrigerated centrifuge (MPW, Poland) at 4°C (2000g, 15 min). After supernatant removing, the sediment was supplemented with the sucrose (Appli Chem, Germany) and gelatin (Genesis, Ukraine) in the following concentrations (by volume): medium 1 – 5% sucrose; medium 2 – 3% gelatin and 5% sucrose; medium 3 – 1% gelatin and 5% sucrose; medium 4 – 10% sucrose. All the media contained additionally 0.5% BSA.

The viral suspension in the specified protective media was poured into the sterile glass vials by 1 ml using mechanical dispenser (Biohit Proline Plus, Finland) and sublimated in freeze-dryer (VirTis, USA). The virus was frozen-dried under conditions of industrial production according to the technological regulations, developed by the PJSC Pharmstandard-Biolik to dry the viral vaccines. The preparations were frozen down to –49°C, the freeze-drying was started at –32°C. The drying time was 16 hrs, the final drying lasted 5 hrs, and the total freeze-drying cycle took 67 hrs. The residual moisture of the specimen was 2–3%.

After freeze-drying, the vials with the specimens were sealed with rubber stoppers and aluminum caps, then placed for storage at 5°C into refrigerator (National Lab, Germany), and at –20 and –80°C into freezers (National Lab, Germany). The effect of freeze-drying and storage on the virus survival was estimated by comparing with its initial infectious



дарт-Биолек» технологическому регламенту для сушки вирусных вакцин. Препараты замораживали до -49°C , лиофилизацию начинали при -32°C . Время сушки составило 16 часов, досушивания – 5 ч общего цикла лиофилизации – 67 ч. Остаточная влажность образцов соответствовала 2–3%.

После лиофилизации флаконы с образцами герметизировали резиновыми пробками и алюминевыми колпачками, помещали для хранения при 5°C в холодильную камеру («National Lab», Германия), при -20 и -80°C – в морозильные камеры («National Lab», Германия). Исследовали влияние лиофилизации и хранения на сохранность вируса по сравнению с его исходной инфекционной активностью до лиофилизации. Сохранность лиофилизированных образцов оценивали перед хранением и через 6, 12, 18 и 24 месяца (срок наблюдения) по следующим регламентным технологическим показателям: внешний вид образца (структура, форма края и вид поверхности таблетки), время растворения, инфекционная активность вируса.

Инфекционную активность вируса определяли *in vitro* путем титрации в культуре клеток ВНК-21/С13. Для этого препараты восстанавливали питательной средой DMEM сразу после лиофилизации, а также через 6, 12, 18 и 24 месяцев хранения при низких температурах (срок наблюдения). Титрацию выполняли в 96-луночных культуральных планшетах («ТРР», Швейцария) в пяти повторах с коэффициентом разведения 5. Клетки культивировали 48 ч в условиях CO_2 -инкубатора при 37°C и 5% CO_2 и фиксировали охлажденным при -20°C ацетоном. Для определения инфекционной активности применяли метод непрямой флуоресценции: клеточный монослой окрашивали специфическими моноклональными антителами к вирусу бешенства, мечеными изотиоцианатом флуоресцеина («Fujirebio US Inc.», США). Используя лабораторный микроскоп («Leica DM2000», Германия) с модулем флуоресценции и увеличением 100, выявляли наличие или отсутствие в каждой лунке планшета яркого свечения зеленого цвета (рис. 1). При этом наличие свечения указывало на заражение клеток вирусом бешенства.

Значение инфекционной активности образцов рассчитывали методом Спирмена-Кербера и выражали в десятичном логарифме 50%-й инфицирующей дозы для культуры клеток ($\lg \text{CCID}_{50}$):

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

где x_0 – \lg обратного наибольшего разведения, в котором во всех лунках отмечается положитель-

activity prior to freeze-drying. The survival of frozen-dried specimens was assessed before storage and 6, 12, 18 and 24 months later (observation period) according to the following technological parameters: the specimen appearance (structure, edge shape and tablet surface appearance), dissolution time, virus infectious activity.

The virus infectious activity was determined *in vitro* by titration in the ВНК-21/С13 cell culture. For this purpose the preparations were recovered with DMEM culture medium right after freeze-drying, as well as after 6, 12, 18, and 24 months of storage at low temperatures (observation period). The titrations was performed in 96-well culture plates (ТРР, Switzerland) in five repeats with dilution factor 5. The cells were cultured for 48 hrs in CO_2 incubator at 37°C and 5% CO_2 and fixed with cold acetone (-20°C). To determine an infectious activity, the method of indirect fluorescence was used, *i. e.* the cell monolayer was stained with specific monoclonal antibodies to rabies virus, labeled with fluorescein isothiocyanate (Fujirebio US Inc., USA). Using a laboratory microscope (Leica DM 2000, Germany) with fluorescence module and $\times 100$ magnification, we revealed the presence or absence of a bright green luminescence in each well (Fig. 1). Herewith, the luminescence presence indicated the cell infection with rabies virus.

The value of infectious activity of the specimens was calculated by the Spearman-Kärber method and expressed in decimal logarithm of 50% cell culture infectious dose ($\lg \text{CCID}_{50}$):

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

where x_0 is \lg of reciprocal highest dilution, where a luminescence is observed in all the wells; d is \lg of dilution factor; r_i is number of wells with observed luminescence in each dilution of viral suspension titration; n_i is total number of wells per each dilution of viral suspension titration [2, 11, 14].

The data were statistically processed with the Excel (Microsoft, USA) and Statistica 10 (StatSoft, USA) software standard packages and the analysis of variance (one-way, factorial using main effects ANOVA), *i. e.* the significance of differences between the mean values was determined and the significance of influence of each factor on the variability of characteristic was evaluated. Differences were considered as statistically significant at $p < 0.05$ [15].

Results and discussion

After completing the freeze-drying cycle, the virus specimens were visually assessed (Fig. 2). The findings testified to the fact, that the structure,



ное свечение; d – lg фактора разведения; r_i – количество лунок с положительным свечением в каждом разведении титрации вирусной суспензии; n_i – общее количество лунок для каждого разведения титрации вирусной суспензии [1, 14, 15].

edge shape and the surface appearance of the freeze-drying depended on the amount of gelatin and sucrose in protective media.

After freeze-drying in the media 1, 2 and 4, the specimens had a porous structure, uneven edges and

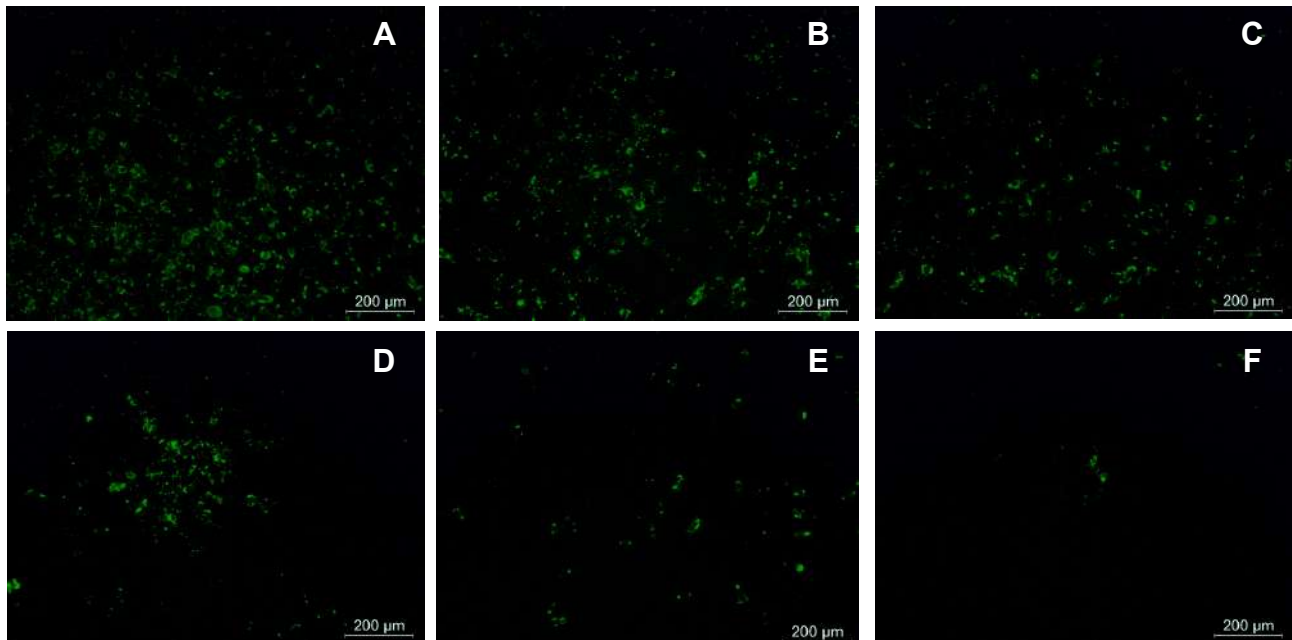


Рис. 1. Монослой культуры клеток ВНК-21/С13, зараженной вирусом бешенства штамма L. Pasteur в разных разведениях: **А** – 1:5; **В** – 1:25; **С** – 1:125; **Д** – 1:625; **Е** – 1:3125; **Ф** – 1:15625. Окрашивание специфическими моноклональными антителами к вирусу бешенства, мечеными изотиоцианатом флуоресцеина.

Fig. 1. Monolayer of BHK-21/C13 cell culture, infected with L. Pasteur rabies virus strain in various dilutions: **A** – 1:5; **B** – 1:25; **C** – 1:125; **D** – 1:625; **E** – 1:3125; **F** – 1:15625. Staining with specific monoclonal antibodies to rabies virus, labeled with fluorescein isothiocyanate.

Статистический анализ данных осуществляли с помощью стандартных пакетов компьютерных программ «Excel» («Microsoft», США) и «Statistica 10» («StatSoft», США) и метода дисперсионного анализа (one-way, factorial и main effects ANOVA): определяли значимость различий между средними значениями и оценивали значимость влияния каждого из факторов на изменчивость признака. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [5].

Результаты и обсуждение

После окончания цикла лиофилизации образцы вируса визуально оценивали по внешнему виду препаратов (рис. 2). Результаты наблюдений свидетельствуют о том, что структура, форма края и вид поверхности лиофилизата зависят от количества желатина и сахарозы в защитных средах.

После лиофилизации в средах 1, 2 и 4 образцы имели пористую структуру, неровные края и матовую поверхность. Добавление в ходе сублимации среды 3 обеспечивало однородность струк-

a matte surface. The medium 3 using during sublimation resulted in a homogeneous structure, smooth edges and a shiny surface of samples. The storage specimens within 6, 12, 18 and 24 months at all the temperature regimens had no effect on frozen-dried sample appearance.

Statistical analysis revealed a strong effect of protective media and storage temperature on dissolution time of virus preparations, herewith the contribution of protective medium composition was greater. The storage time of specimens at all the temperatures had no significant effect on dissolution time of frozen-dried virus. The Fig. 3 shows the data after a 24-month storage of specimens at different temperatures. The dissolution time of preparations after storage at 5°C was significantly lower than at –80°C in the media 1, 2 and 3, and at –20°C in the media 1 and 2. The introduction of 3% gelatin (medium 2) into a protective medium was established to significantly increase the dissolution time of preparation, thereby complicating its practical use. The dissolution time for the

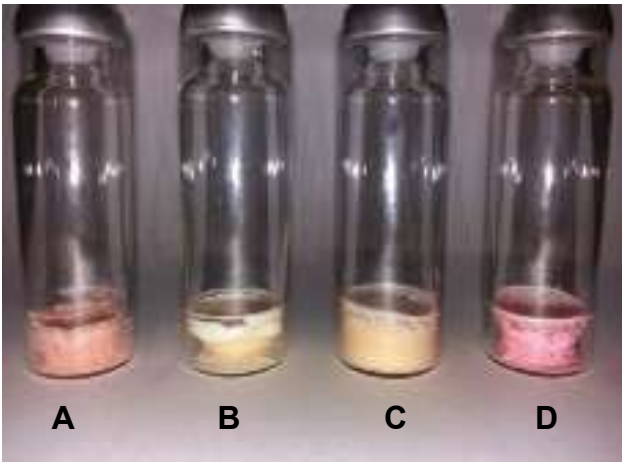


Рис. 2. Внешний вид образцов вируса бешенства штамма L. Pasteur после лиофилизации в защитных средах: **A** – среда 1; **B** – среда 2; **C** – среда 3; **D** – среда 4.

Fig. 2. The appearance of L. Pasteur rabies virus strain specimens after freeze-drying in protective media: **A** – medium 1; **B** – medium 2; **C** – medium 3; **D** – medium 4.

туры, ровные края и блестящую поверхность препаратов. Хранение образцов в течение 6, 12, 18 и 24 месяцев при всех температурных режимах не влияло на внешний вид лиофилизата.

При статистическом анализе установлено, что на время растворения препаратов вируса значительно влияли защитные среды и температура хранения, при этом больший вклад вносил состав защитной среды. Срок хранения препаратов при всех температурах значительно не влиял на время растворения сублимированного вируса. На рис. 3 представлены данные 24-месячного хранения образцов при разных температурах. Время растворения препаратов после хранения при 5°C было статистически значимо меньше, чем при –80°C в средах 1, 2 и 3, при –20°C – в средах 1 и 2. Установлено, что добавление 3% желатина (среда 2) в защитную среду значительно увеличивает время растворения препарата, что затрудняет его практическое использование. Время растворения образцов, лиофилизированных в средах 3 и 4, было значимо больше, чем в среде 1, но соответствовало производственному регламенту (не более минуты). Статистически значимые различия во времени растворения образцов со средами 3 и 4 были установлены только при температуре хранения –80°C.

После оценки влияния лиофилизации на показатель инфекционной активности вируса нами получены следующие результаты. Исходная инфекционная активность до лиофилизации составляла $(5,38 \pm 0,15) \lg \text{CCID}_{50}$ (рис. 4). После сублимации во всех образцах выявлено ее значимое снижение по сравнению со значением до лиофи-

specimens, frozen-dried in the media 3 and 4, was significantly longer than in the medium 1, but still complied with the manufacturing instructions (*i. e.* no more than 1 min). Statistically significant differences in the specimens dissolution time with the media 3 and 4 were established only at –80°C storage temperature.

After evaluating the freeze-drying effect on the rate of the virus infection activity, the following data were obtained. The initial infectious activity prior to freeze-drying was $(5.38 \pm 0.15) \lg \text{CCID}_{50}$ (Fig. 4). After drying, its significant decrease was revealed in all the specimens in comparison with the value before freeze-drying. The highest index of the virus infectious activity was established in the specimens, frozen-dried in the medium 3 (91%). In those, dried in the media 1, 2, and 4, it was 86, 81, and 84%, respectively, of the values prior to freeze-drying. No statistically significant differences in the indices of infectious activity of frozen-dried virus from the specimens 1 and 4, 2 and 4 were found.

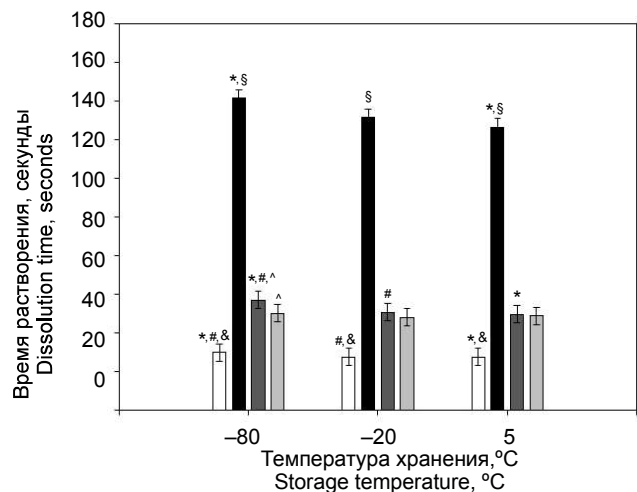


Рис. 3. Время растворения образцов вируса бешенства штамма L. Pasteur, лиофилизированных в разных защитных средах, после 24-месячного хранения при разных температурах; □ – среда 1; ■ – среда 2; ■ – среда 3; ■ – среда 4; * – различия статистически значимы между температурами –80 и 5°C; # – различия статистически значимы между температурами –80 и –20°C; § – время растворения значимо ниже, чем в других средах; § – время растворения значимо выше, чем в других средах; ^ – различия статистически значимы между средами 3 и 4.

Fig. 3. Dissolution time of L. Pasteur rabies virus strain specimens, frozen-dried in various protective media after 24-month storage at different temperatures; □ – medium 1; ■ – medium 2; ■ – medium 3; ■ – medium 4; * – differences are statistically significant between –80 and 5°C; # – differences are statistically significant between –80 and –20°C; § – dissolution time is significantly lower versus other media; § – dissolution time is significantly higher versus other media; ^ – differences are statistically significant between media 3 and 4.



лизации. Наиболее высокий показатель инфекционной активности вируса установлен в образцах, лиофилизированных в среде 3 (91%), в образцах, высушенных в средах 1, 2 и 4, – 86, 81 и 84% соответственно по сравнению с данными до лиофилизации. Статистически значимые различия показателей инфекционной активности сублимированного вируса из образцов 1 и 4, 2 и 4 обнаружены не были.

Установлено, что на инфекционную активность лиофилизированного вируса, хранившегося в течение 24 месяцев, в разной степени влияли температура, срок хранения и состав защитной среды (рис. 5). Статистический анализ данных показал, что через 6 месяцев степень влияния защитной среды выше, чем температурных условий хранения, через 12 месяцев эти факторы имели одинаковое влияние, а через 18 и 24 месяца температура хранения была определяющим параметром.

С целью установления эффективных температурных условий хранения в качестве контрольного показателя использовали инфекционную активность вируса перед хранением (рис. 5). Так, активность вируса после 6-месячного хранения препаратов при -80°C не изменялась во всех образцах, при -20°C в средах 1–3 оставалась на том же уровне, а в среде 4 значительно снижалась по сравнению с контролем и хранением при -80°C .

Инфекционная активность во всех образцах после 12- и 6-месячного хранения была аналогична. Через 18 месяцев хранения во всех препаратах установлено значимое снижение инфекционной активности вируса по сравнению с 12-месячным хранением, а по сравнению с контролем – кроме препаратов в среде 2, хранившихся при -80°C . Через 24 месяца во всех образцах наблюдалось дальнейшее значимое снижение инфекционного титра по сравнению с их 18-месячным хранением при температуре 5°C , а также в образцах со средами 2–4 при -20°C . В остальных образцах активность также снизилась, но показатели значимо не отличались от таковых после 18-месячного хранения. На всех сроках хранения при 5°C инфекционная активность вируса во всех образцах была значимо ниже по сравнению с контролем и препаратами, хранившимися при -20 и -80°C . Минимальные потери активности были выявлены в образцах, хранившихся при -80°C .

На рис. 5 также представлены результаты статистического анализа степени влияния состава защитных сред на сохранность вируса при разных температурах хранения. Установлено, что при всех температурах (5 , -20 , -80°C) в течение 24 месяцев хранения максимальный защитный эффект оказывала среда 3. Более выраженная эф-

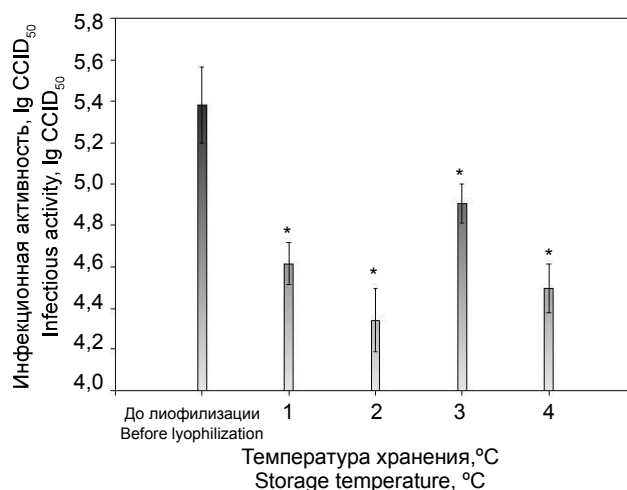


Рис. 4. Инфекционная активность вируса бешенства штамма L. Pasteur после лиофилизации в разных защитных средах; * – различия статистически значимы по сравнению с инфекционной активностью вируса до лиофилизации ($p < 0,05$; $n = 5$).

Fig. 4. Infectious activity of L. Pasteur rabies virus strain after freeze-drying in various protective media; * – differences are statistically significant as compared with the virus infectious activity prior to freeze-drying ($p < 0.05$; $n = 5$).

The infectious activity of the frozen-dried virus, stored for 24 months was established to be differently affected by temperature and storage time, as well as the protective medium composition (Fig. 5). Statistical analysis of the data showed that after 6 months later the influence of protective medium was higher than that of temperature storage conditions, 12 months later these factors had the same effect, and after 18 and 24 months the storage temperature became the determining parameter.

In order to establish the efficient temperature storage conditions, the virus infectious activity prior to storage was used as a control index (see Fig. 5). The virus activity after 6-month storage of preparations at -80°C remained unchanged in all the specimens, at -20°C in the media 1–3 it remained at the same level, but in the medium 4 it significantly decreased as compared to the control and storage at -80°C .

Infectious activity in all the specimens after 12- and 6-month storages was similar. After 18-month storage, a significant decrease in infectious activity of the virus was found in all the specimens as compared to 12-month storage, but excepting those in the medium 2, stored at -80°C versus the control. After 24 months, further significant decrease in infectious titer was observed in all the specimens, as compared to their 18-month storage at 5°C , as well as in the specimens processed in the media 2–4 at -20°C . In the remaining specimens, the activity was also decreased, but the indices did not significantly differ



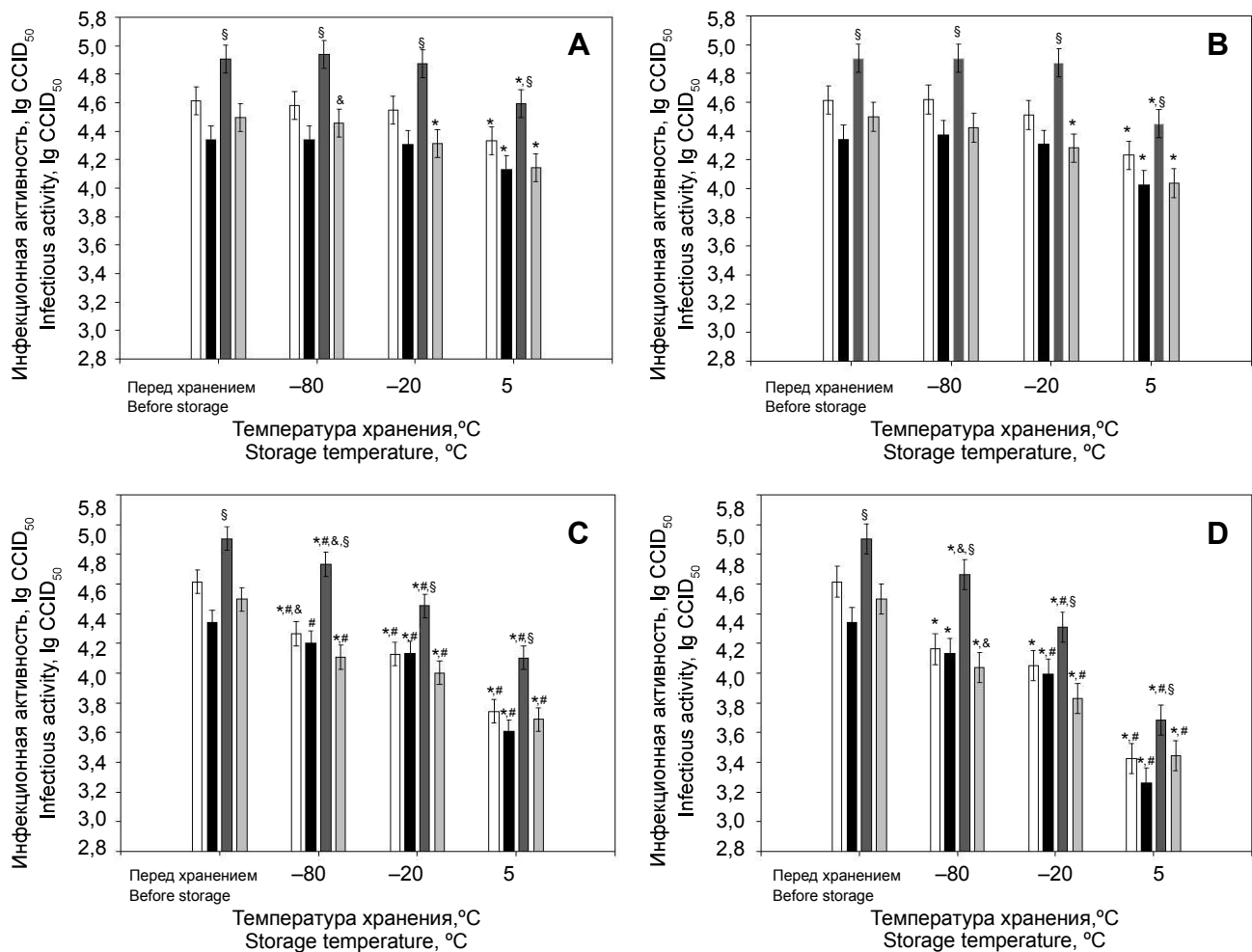


Рис. 5. Инфекционная активность вируса бешенства штамма L. Pasteur, лиофилизированного в различных средах, после хранения при температурах 5, -20 и -80°C, в течение разных сроков хранения: **A** – 6 месяцев; **B** – 12 месяцев; **C** – 18 месяцев; **D** – 24 месяца; □ – среда 1; ■ – среда 2; ■ – среда 3; ■ – среда 4; * – различия статистически значимы по сравнению с активностью перед хранением; # – различия статистически значимы по сравнению с предыдущим сроком хранения; & – инфекционная активность при -80°C значимо выше, чем при -20°C; § – максимальный значимый эффект по сравнению с другими средами ($p < 0,05$; $n = 5$).

Fig. 5. Infectious activity of L. Pasteur rabies virus strain, frozen-dried in various media after storage at 5, -20 and -80°C during different storage periods: **A** – 6 months; **B** – 12 months; **C** – 18 months; **D** – 24 months; □ – medium 1; ■ – medium 2; ■ – medium 3; ■ – medium 4; * – differences are statistically significant as compared with the activity prior to storage; # – differences are statistically significant as compared with previous storage time; & – infectious activity at -80°C is significantly higher than at -20°C; § – the maximum significant effect versus other media ($p < 0,05$; $n = 5$).

фективность, вероятно, обусловлена наличием двух защитных компонентов – 1% желатина и 5% сахарозы. Известно, что сахара способны образовывать водородные связи с полярными и заряженными группами по мере удаления воды, что предотвращает повреждение биомолекул вирионов в процессе лиофилизации [12, 17]. Белки стабилизируют структурные компоненты вирусной частицы, препятствуют слипанию вирионов и изменению pH среды [8, 9]. Такое сочетанное действие защитных механизмов обуславливает преимущества среды 3 перед сахаросодержащими средами 1 и 4.

Выраженность защитного эффекта сред 2 и 3 связана с концентрацией в них желатина (3 и 1%

from those after 18-month-long storage. At all the storage terms at 5°C, the virus infectious activity in all the specimens was significantly lower as compared to the control and preparations, stored at -20 and -80°C. The minimum loss of activity was revealed in the specimens, stored at -80°C.

The Fig. 5 presents the analysis of impact of protective media composition on the virus survival at different storage temperatures. The medium 3 was established to have the maximum protective effect at all the temperatures (5, -20, -80°C) within 24 months of storage. More pronounced efficiency was most likely due to the presence of two protective components, *i. e.* 1% gelatin and 5% sucrose. It is known that sugars are capable of for-



соответственно). Поскольку все образцы лиофилизировали одновременно по одному технологическому регламенту сушки, то можно предположить, что матрица из среды 2, которая формировалась при сублимации, в меньшей мере предотвращала разрушение вирусных частиц на всех технологических этапах (сублимация и последующее хранение).

Различия сохранности лиофилизированного вируса в процессе хранения при различных температурах связаны с остаточной влажностью высушенных образцов. При температурах 5 и -20°C наличие охлажденной и переохлажденной окружающей воды способствуют химическим и биохимическим реакциям, которые приводят к инаktivации вируса. При -80°C заканчивается кристаллизация связанной воды, и вирионы находятся в состоянии, близком к анабиозу.

Полученные результаты подтверждают необходимость подбора индивидуальных режимов сушки при лиофилизации вирусов в защитных средах с различным составом.

Выводы

1. Долгосрочное хранение лиофилизированного вируса бешенства штамма L. Pasteur при температуре -80°C значительно более эффективно, чем при температурах 5 и -20°C .

2. Для лиофилизации штамма L. Pasteur целесообразно использовать защитную среду следующего состава: питательная среда DMEM с добавлением 0,5% БСА, 1% желатина, 5% сахарозы.

3. Применение разработанной защитной среды для лиофилизации вируса бешенства позволило сохранить 91% его исходной инфекционной активности.

Литература

1. Буркова ВВ, Высеканцев ИП, Лаврик АА. Сохранность инфекционной активности промышленных штаммов вируса бешенства, хранившихся при различных температурах. Живые и биокосные системы [Интернет]. 2014; (9):1–11. [Цитировано 19.09.18] Доступно на: <http://www.jbks.ru/archive/issue-9/article-23>.
2. Груздев ЛК, Уласов ВИ, Груздев КН. Оценка эффективности стабилизирующих сред при изготовлении стандартного образца штамма CVS фиксированного вируса бешенства. Ветпатология. 2007; (4):32–7.
3. Львов ДК, редактор. Медицинская вирусология. Москва: МИА; 2008. 656 с.
4. Полупан ІМ. Оцінка різних методів зберігання вакцинних штамів вірусу сказу. Ветеринарна біотехнологія. 2011; (20):127–33.
5. Рокицкий ПФ. Биологическая статистика. Минск: Высшая школа; 1973. 320 с.
6. Стародубова ЕС, Преображенская ОВ, Кузьменко ЮВ. Вакцины против бешенства: современное состояние и пер-

ming hydrogen bonds with polar and charged groups if the water is removed, thereby preventing the damage of virion molecules during freeze-drying [9, 17]. The proteins stabilize the structural components of viral particle, prevent the adhesion of virions and changes in medium pH [3, 5]. This combined effect of protective mechanisms stipulates the advantages of the medium 3 over the sugar-containing media 1 and 4.

The manifestation of protective effect for the media 2 and 3 was related to gelatin concentration in the media (3 and 1%, respectively). Since all the specimens were frozen-dried simultaneously according to the same technological procedure of drying, it might be assumed that the matrix from the medium 2, formed during drying, to a lesser extent prevented the virus particles destruction at the technological stages (drying and further storage).

The differences in survival of frozen-dried virus during storage at various temperatures are associated with residual moisture of dried specimens. At 5 and -20°C the presence of cooled and supercooled water in the samples allows the chemical and biochemical reactions, entailing the virus inactivation. At -80°C the bound water is crystallized and the virions are in a state close to anabiosis.

Our findings confirm the necessity to select the individual drying regimens when freeze-drying the viruses in protective media with various composition

Conclusions

1. The temperature of -80°C was significantly more efficient for a long-term storage of frozen-dried the L. Pasteur rabies virus strain, than 5 and -20°C .

2. To freeze-dry this strain, it was expedient to use a protective medium of the following composition: DMEM culture medium supplemented with 0.5% bovine serum albumin, 1% gelatin and 5% sucrose.

3. The use of the developed protective medium for the rabies virus freeze-drying enabled to preserve 91% of its original infectious activity.

References

1. ATCC. Virology guide. Tips and techniques for propagating virus in tissue culture and embryonated chicken eggs. [Internet]. Manassas: ATCC; 2016. 32 p. [Cited 25.09.18] Available from: https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/Virology_Guide.ashx.
2. Burkova VV, Vysekantsev IP, Lavrik AA. [Preservation of infectious activity of rabies virus industrial strains stored at various temperatures]. Zhivye Biokosnye Sist. [Internet]. 2014; (9):1–11. [Cited 19.09.18] Available from: <http://www.jbks.ru/archive/issue-9/article-23>. Russian.

- спективы развития. Молекулярная биология. 2015; 49(4): 577–84.
7. ATCC. Virology guide. Tips and techniques for propagating virus in tissue culture and embryonated chicken eggs [Internet]. Manassas: ATCC; 2016. 32 p. [Cited 25.09.18] Available from: https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/Virology_Guide.ashx.
 8. Gould EA. Methods for long-term virus preservation. *Molecular biotechnology*. 1999; 13(1):57–66.
 9. Johnson FB. Transport of viral specimens. *Clinical Microbiology Reviews*. 1990; 3(2):120–31.
 10. Lalošević D, Lalošević V, Lazarević-Ivanc LJ, Knežević I. BHK-21 cell culture rabies vaccine: immunogenicity of a candidate vaccine for humans. *Dev Biol*. 2008; 131:421–9.
 11. Lalošević D, Stankov S, Lazarević-Ivanc L, et al. Immunogenicity of BHK-rabies vaccine in human volunteers. *Medicinski pregled*. 1998; 51:17–9.
 12. Malenovská 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; 117(6):1810–19.
 13. McAleer WJ, Markus HZ, McLean AA, et al. Stability on storage at various temperatures of live measles, mumps and rubella virus vaccines in new stabilizer. *Journal of Biological Standardization*. 1980; 8(4):281–7.
 14. Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: WHO; 1996. 446 p.
 15. OIE. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* [Internet]. Paris: World Organisation for Animal Health; 2018. Chapter 2.1.17, Rabies; p. 1–28. [Cited 25.09.18] Available from: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>.
 16. Phillips GO, Harrop R, Wedlock DJ, et al. A study of water binding in lyophilized viral vaccine systems. *Cryobiology*. 1981; 18(4):414–9.
 17. 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.
 18. Varyantsia VV, Vysekantsev IP. Storage methods of complex RNA viruses. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 27(4): 287–95.
 19. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs. In: WHO Technical Report Series – 941. Fifty-sixth report. Geneva: WHO; 2007. p. 83–132.
 3. Gould EA. Methods for long-term virus preservation. *Molecular Biotechnology*. 1999; 13(1):57–66.
 4. Gruzdev LK, Ulasov VI, Gruzdev KN. [Estimation of the effectiveness of stabilizing media in the manufacture of a standard sample of the CVS strain of a fixed rabies virus]. *Vetpatologiya*. 2007; (4):32–7. Russian.
 5. Johnson FB. Transport of viral specimens. *Clinical Microbiology Reviews*. 1990; 3(2):120–31.
 6. Lalošević D, Lalošević V, Lazarević-Ivanc LJ, Knežević I. BHK-21 cell culture rabies vaccine: immunogenicity of a candidate vaccine for humans. *Dev Biol*. 2008; 131:421–9.
 7. Lalošević D, Stankov S, Lazarević-Ivanc L, et al. Immunogenicity of BHK-rabies vaccine in human volunteers. *Medicinski Pregled*. 1998; 51:17–9.
 8. Lvov DK, editor. [Medical virology]. Moscow: MIA; 2008. 656 p. Russian.
 9. Malenovská 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; 117(6):1810–9.
 10. McAleer WJ, Markus HZ, McLean AA, et al. Stability on storage at various temperatures of live measles, mumps and rubella virus vaccines in new stabilizer. *Journal of Biological Standardization*. 1980; 8(4):281–7.
 11. Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: WHO; 1996. 446 p.
 12. Phillips GO, Harrop R, Wedlock DJ, et al. A study of water binding in lyophilized viral vaccine systems. *Cryobiology*. 1981; 18(4):414–9.
 13. Polupan IM. [Estimation of different storage methods of rabies virus vaccine strains]. *Veterinarna Blotehnologiya*. 2011; (20): 127–33. Ukrainian.
 14. OIE. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* [Internet]. Paris: World Organisation for Animal Health; 2018. Chapter 2.1.17, Rabies; p. 1–28. [Cited 25.09.18] Available from: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>.
 15. Rokickij PF. [Biological statistics]. Minsk: Vysshaya shkola; 1973. 320 p. Russian.
 16. Starodubova ES, Preobrazhenskaya OV, Kuzmenko YuV. [Vaccines against rabies: current status and development prospects]. *Molekulyarnaya Biologiya*. 2015; 49(4):577–84. Russian.
 17. 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.
 18. Varyantsia VV, Vysekantsev IP. Storage methods of complex RNA viruses. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 27(4): 287–95.
 19. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs. In: WHO Technical Report Series – 941. Fifty-sixth report. Geneva: WHO; 2007. p. 83–132.