

## Хранение штаммов вируса бешенства *L. Pasteur* и CVS при низких температурах под защитой криопротекторов

В.В. Буркова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков  
ПАО «Фармстандарт-Биолек», г. Харьков

## Storage of Rabies Virus Strains *L. Pasteur* and CVS at Low Temperatures Using Cryoprotectants

V.V. Burkova

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine  
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine  
Public Joint-Stock Company Pharmstandard-Biolik, Kharkiv, Ukraine

Технология производства антирабических препаратов предусматривает долгосрочное хранение вирусной суспензии при низких температурах. В предыдущих исследованиях было показано, что в ходе хранения вируса бешенства в поддерживающих средах при низких температурах его активность снижается [Буркова В.В. и др., 2014]. В связи с этим целью данного исследования было изучение сохранности вируса бешенства после хранения при температурах  $-20$  и  $-80^{\circ}\text{C}$  под защитой различных криопротекторов.

Объектами исследования были фиксированные штаммы вируса бешенства *L. Pasteur* и CVS. К вирусной суспензии в поддерживающие среды добавляли следующие криозащитные вещества: желатин (1 и 3%), сахарозу (2,5; 5; 7,5 и 10%), глицерин (2,5; 5; 7,5 и 10%), диметилсульфоксид (ДМСО) (2,5; 5; 7,5 и 10%), альгинат Na (1, 2, 3%), пептон (2,5; 5; 7,5 и 10%). Образцы вносили в пластиковые криопробирки с рабочим объемом 1,8 мл и замораживали в морозильных камерах при  $-20$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  без контроля скорости охлаждения, размораживали через неделю, 1, 3, 6 месяцев хранения (срок наблюдения). Титр вируса выражали в десятичном логарифме 50%-й фокусформирующей инфицирующей дозы (lg FFD50).

Было установлено, что при хранении вирусов в течение 6 месяцев (срок наблюдения) в поддерживающих средах без криопротекторов инфекционная активность образцов снижалась. Более выраженную гибель вируса наблюдали в ходе хранения при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

После хранения (при  $-20^{\circ}\text{C}$ ) образцов вируса штамма *L. Pasteur* с криопротекторами обнаружено защитное действие желатина (1–3%), сахарозы (5–10%), глицерина (5–10%) и ДМСО (5%). Гель альгината Na криопротективного действия не оказывал. В образцах с пептоном происходила значимая гибель вируса. В процессе хранения данного штамма при  $-80^{\circ}\text{C}$  значимым криопротективным эффектом обладали все исследованные вещества, за исключением пептона: желатин (в концентрации 3%), сахароза (10%), глицерин (2,5–10%), ДМСО (2,5–10%), гель альгината Na (2–3%).

В ходе хранения штамма CVS при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  защитное действие оказывали желатин (в концентрации 3%), сахароза (2,5–10%), глицерин (2,5–10%), ДМСО (5–7,5%). В образцах с альгинатом Na и пептоном наблюдали дополнительную гибель вируса. Во время хранения данного штамма при  $-80^{\circ}\text{C}$  изученные криопротекторные вещества защитного эффекта не оказывали.

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности применения криопротекторных веществ для хранения фиксированных штаммов вируса бешенства при температурах  $-20$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  с учетом индивидуальной чувствительности штаммов к замораживанию в различных консервирующих средах.

Technology of anti-rabies drug production involves a long-term storage of viral suspension at low temperatures. Previously it was shown that storage of rabies virus in the supporting media at low temperatures was accompanied with a decrease in its activity [Burkova V.V. *et al.*, 2014]. The aim of this study was to examine the survival of rabies virus after storage at temperatures of  $-20$  and  $-80^{\circ}\text{C}$  under the protection of various cryoprotectants.

The research objects were the fixed rabies virus strains *L. Pasteur* and CVS. The viral suspension in supporting media were supplemented with the following cryoprotective agents: gelatin (1 and 3%), sucrose (2.5, 5, 7.5 and 10%), glycerol (2.5, 5, 7.5 and 10%) dimethyl sulfoxide (DMSO) (2.5, 5, 7.5 and 10%), sodium alginate (1, 2, 3%), peptone (2.5, 5, 7.5 and 10%). The samples were transferred into plastic cryovials with 0.8 ml handling volume and frozen in a freezer at  $-20$  or  $-80^{\circ}\text{C}$  without cooling rate control; thawed in a week, 1, 3 and 6 months of storage (observation time). The virus titer was expressed in decimal logarithm of 50% focus-forming infective dose (lg FFD50).

It has been found that during storage of viruses for 6 months (observation time) in the supporting media with no cryoprotectants, an infectious activity of the samples decreased. More pronounced virus death was observed during storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Following storage (at  $-20^{\circ}\text{C}$ ) of the strain *L. Pasteur* virus samples with cryoprotectants a protective effect was found after using gelatin (at 1.3% concentration), sucrose (5–10%), glycerol (5–10%) and DMSO (5%). Sodium alginate gel had no cryoprotective action. In the samples with peptone a crucial death of the virus took place. During storage of the strain at  $-80^{\circ}\text{C}$  all the investigated substances except peptone rendered a significant cryoprotective effect: gelatin (3%), sucrose (10%), glycerol (2.5–10%), DMSO (2.5–10%) and sodium alginate gel (2–3%).

Storage of CVS strain at  $-20^{\circ}\text{C}$  revealed a protective effect of gelatin (3%), sucrose (2.5–10%), glycerol (2.5–10%), and DMSO (5–7.5%). In the samples with sodium alginate and peptone an extra death of the virus was observed. During storage of this strain at  $-80^{\circ}\text{C}$  the studied cryoprotective agents had no protective effect.

The findings indicate the expediency of applying the cryoprotective agents for storage of fixed rabies virus strains at temperatures of  $-20$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$ , taking into account the sensitivity of individual strains to freezing in various preserving media.

