

УДК 578.824.11:57.043:578.22:578.72

В.В. Варяниця^{1,2*}, І.П. Висеканцев¹

Вплив температурних режимів зберігання та складу захисних середовищ на збереженість вірусу сказу штаму CVS

UDC 578.824.11:57.043:578.22:578.72

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

Impact of Storage Temperature Regimens and Protective Media Composition on Rabies Virus CVS Strain Preservation

Реферат: Досліджено вплив захисних середовищ із сахарозою, гліцерином і мальтозою на збереження вірусу сказу штаму CVS у процесі зберігання за 37, 5, –20, –80 та –196°C. Встановлено, що температурний режим 37°C не придатний для зберігання вірусу, 5°C може використовуватися за виробничої необхідності для нетривалого зберігання у відповідному захисному середовищі. Показано, що зберігання за –80 та –196°C у середовищах консервування на основі DMEM з 0,5% фетальної сироватки великої рогатої худоби з додавання або 5% сахарози, або 5% гліцерину, або 5% мальтози або суміші сахарози з гліцерином забезпечує високі показники інфекційної активності вірусу сказу штаму CVS протягом 24 місяців (термін спостереження). За температури –20°C у ростовому середовищі з сахарозою і сумішшю сахарози з гліцерином через 6 місяців було збережено 79–82% вихідної активності вірусу, а через 12 місяців – 69–72%. Після досягнення –80°C і у процесі подальшого зберігання зразків вірусу за цієї температури в досліджуваних середовищах консервування вторинна кристалізація концентрованих розчинених речовин була пролонгована.

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

Abstract: The impact of protective media supplemented with sucrose, glycerol, and maltose on the rabies virus CVS strain preservation during storage at 37, 5, –20, –80, and –196°C has been studied. The temperature regimen of 37°C was found as not suitable for virus storage, but temperature of 5°C could be used for a short-term storage in corresponding protective medium in case of production need. It was shown that storage at –80 and –196°C in DMEM-based preservation media containing 0.5% fetal bovine serum, supplemented with either 5% sucrose, or 5% glycerol, or 5% maltose, or sucrose and glycerol mixture provided high levels of the rabies virus CVS strain infectious activity within 24 months (observation period). At –20°C, in a growth medium with sucrose and mixture of sucrose and glycerol, after 6 months 79–82% of the initial virus activity were preserved, and after 12 months that was 69–72%. Upon reaching –80°C and during subsequent storage of virus samples at this temperature in the studied preservation media, the secondary crystallization of concentrated dissolved substances was prolonged.

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

Сказ – небезпечне нейровірусне захворювання з найвищим коефіцієнтом смертності серед інших інфекцій. Основним заходом боротьби з ним є профілактика, до якої входить вакцинація свійських та диких тварин і введення антирабічних вакцин та імуноглобулінів людям після укусу та контакту з інфікованими тваринами [3, 11, 16–19]. Відповідно до рекомендацій ВООЗ виробництво даних препаратів контролюється з використанням фіксованого штаму вірусу сказу CVS [9, 11, 17].

Якість антирабічних препаратів у ході виробництва можна забезпечити лише за наявності достатніх запасів вірусу сказу штаму CVS, отри-

Rabies is a dangerous neuroviral disease with the highest mortality rate among other infections. The main way to combat the rabies is the prophylaxis, involving the domestic and wild animal vaccination and introduction of anti-rabies vaccines and immune globulins to humans after bite and contact with infected animals [5, 9, 15–18]. According to the WHO guidelines, the production of these drugs is monitored using the fixed rabies virus CVS strain [7, 9, 16].

The quality of rabies products in manufacturing may be only ensured when sufficient stocks of the rabies virus CVS strain, obtained from a single batch is available. For this purpose, one applies

¹Відділ кріомікробіології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

²Відділ розробки клітинних біотехнологій, АТ «БІОЛІК», м. Харків, Україна

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

²Cell Biotechnology Development Department, JSC '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 19.01.2020

Прийнята до друку 23.04.2020

Received January, 23, 2020

Accepted April, 23, 2020

© 2020 V.V. Varyanytsia, 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.

маного з однієї серії. З цією метою застосовують ефективні та доступні методи довгострокового зберігання вірусу сказу, оскільки дефектні або інактивовані вірусні частинки конкурують із повноцінними віріонами за зв'язування специфічних антитіл [15].

Основними методами консервування вірусу сказу є ліофілізація та зберігання за різних низьких температур. Ліофілізації штаму CVS обмежена, оскільки для подальшого використання вірус необхідно неодноразово пасивувати. Найбільш поширене зберігання великих об'ємів вірусу у комерційних морозильних камерах при $-20...-85^{\circ}\text{C}$ [3, 6, 9, 10, 15, 16]. Для покращення збереженості матеріалу у середовища вводять захисні домішки: ді- та полісахариди, спирти, диметилсульфоксид, сироватку та альбумін крові тварин, а також інші органічні речовини [3, 6, 8–10, 15]. Результати проведених у цьому напрямку досліджень суперечливі та не доказують ефективність певного консервуючого середовища при різних температурах зберігання. За рекомендацією ВООЗ вірус сказу штаму CVS слід зберігати у буферному середовищі з додаванням низьких концентрацій компонентів крові великої рогатої худоби (фетальна сироватка, альбумін) за температур від -70 до -80°C , але дані щодо ефективності цього режиму для тривалого зберігання відсутні [11, 17].

Мета дослідження – розробка складу середовищ для довгострокового зберігання вірусу сказу штаму CVS за різних температур в умовах виробництва антирабічних препаратів.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження був фіксований штам вірусу сказу CVS, наданий Державним науково-дослідним інститутом стандартизації та контролю медичних біологічних препаратів ім. Л.О. Тарасевича (Москва, Росія) та адаптований до постійної культури клітин ВНК-21 (clone 13) в АТ «БІОЛІК» (Харків, Україна). Штам задепоновано (свідоцтво №679) у депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів (Київ, Україна).

Відповідно до рекомендацій ВООЗ та Міжнародного епізоотичного бюро у якості субстрату для культивування вірусу використовували постійну клітинну лінію ВНК-21 (clone 13), яка була надана Європейською колекцією клітинних культур («ЕСАСС», Велика Британія) [3, 11, 17].

Перед зараженням клітини лінії ВНК-21 піддавали добовому культивуванню у пристінковому моношарі в стерильних пластикових культуральних флаконах («SPL», Німеччина) у DMEM з до-

the efficient and available methods for rabies virus long-term storage, since the defective or inactivated viral particles compete with integral virions for binding specific antibodies [14].

The main methods for rabies virus preservation are lyophilization and storage at various low temperatures. The CVS strain lyophilization is limited due to a need to its repeated passage for further use. The virus large volumes are most commonly stored in commercial freezing chambers at $-20...-85^{\circ}\text{C}$ [1, 5, 7, 8, 14, 15]. To improve the material preservation, the following additives such as: di- and polysaccharides, alcohols, DMSO, animal blood serum and albumin, as well as other organic substances, are introduced into the medium [1, 5–8, 14]. The findings in this direction are inconsistent and prove no efficiency of the certain preserving medium at different storage temperatures. According to the WHO recommendation, the rabies virus CVS strain should be stored in a buffer medium, supplemented with low concentrated blood components of cattle (fetal serum, albumin) at temperatures ranging from -70 to -80°C , but there are no data on this mode efficiency for a long-term storage [9, 16].

The research aim was to develop the medium composition for a long-term storage of the rabies virus CVS strain at different temperatures in rabies products manufacturing.

Materials and methods

The research object was the fixed rabies virus CVS strain, provided by the L.O. Tarasevich State Research Institute for Standardization and Control of Biomedical Preparation (Moscow, Russia) and adapted to the continuous BHK-21 (clone 13) cell culture at JSC BIOLIK (Kharkiv, Ukraine). The strain was deposited (certificate N 679) at the depository of the State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms (Kyiv, Ukraine).

In accordance with the recommendations of the WHO and the International Epizootics Bureau, the continuous BHK-21 (clone 13) cell line, provided by the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC, United Kingdom) was used as a substrate for virus cultivation [5, 9, 16].

Prior to infecting, the BHK-21 cells were cultured within one day in a wall monolayer in sterile plastic culture flasks (SPL, Germany) in DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, United States). The cells were cultured in CO_2 incubator (Binder, Germany) at 37°C and 5% CO_2 . The culture was infected with a fixed CVS strain with infectious activity ($4.79 \pm$



даванням 10% (v/v) фетальної сироватки великої рогатої худоби (ВРХ) («Sigma-Aldrich», США). Клітини культивували в CO₂-інкубаторі («Binder», Німеччина) при 37°C і 5% CO₂. Культуру заражали фіксованим штамом CVS із інфекційною активністю (4,79 ± 0,15) lg CCID₅₀ (50%-а інфікуюча доза для культури клітин). Експозицію клітин із вірусною суспензією проводили протягом години у CO₂-інкубаторі при 33°C і 5% CO₂. Потім у культуральні флакони вносили ростове середовище (РС) для вірусу на основі DMEM із додаванням 0,5% (v/v) фетальної сироватки ВРХ та культивували вірус як описано вище. На 4-ту добу після зараження вірусну суспензію очищали від клітинного детриту протягом 15 хв при 2000g, 4°C у рефрижераторній центрифугі («MPW», Польща) [3, 16, 17]. У зібраний супернатант вносили сахарозу («AppliChem», Німеччина), гліцерин («AppliChem») і мальтозу («Sigma-Aldrich»). Для зберігання вірусу використовували такі середовища: 1 – РС без домішок; 2 – РС із 5% сахарози; 3 – РС з 5% гліцерину; 4 – РС із 5% сахарози та 5% гліцерину; 5 – РС із 5% мальтози.

Суспензію вірусу в зазначених захисних середовищах механічним дозатором зі змінним об'ємом («Biohit Proline Plus», Фінляндія) вносили по 1 мл у стерильні пластикові криопробірки («SPL») і зберігали у термостаті («Binder») при 37°C; холодильній камері («Liebherr», Німеччина) при 5°C; морозильній камері («National Lab», Німеччина) при –20 і –80°C; посудині Дьюара (Харківський завод транспортного обладнання, Україна) при –196°C. Швидкості охолодження до вказаних температур не контролювали. Інфекційну активність зразків оцінювали перед зберіганням, а також через тиждень та 3, 6, 12, 18 і 24 місяці (термін спостереження).

Досліджуваний показник визначали методом титрації в культурі клітин ВНК-21 у 96-лункових культуральних планшетах («TPP», Швейцарія) у п'яти повторях. Клітини у планшетах культивували в CO₂-інкубаторі при 37°C і 5% CO₂ протягом 48 годин, фіксували охолодженням при –20°C ацетоном і забарвлювали специфічними моноклональними антитілами до вірусу сказу, міченими ізотіоціанатом флуоресцеїну («Fujirebio», США). За допомогою лабораторного мікроскопа («Leica DM2000», Німеччина) з модулем флуоресценції при ×100 враховували наявність у кожній лунці планшета яскравого специфічного світіння зеленого кольору, яке свідчило про зараження клітин вірусом сказу [3, 16]. Інфекційну активність вірусу розраховували методом Спірмена-Кербера і виражали у lg CCID₅₀ [3, 7, 15].

± 0.15) lg CCID₅₀ (50% cell culture infectious dose). The cells with viral suspension were exposed for one hour in a CO₂ incubator at 33°C and 5% CO₂. Then, the DMEM-based growth medium (GM) for virus with 0.5% (v/v) fetal bovine serum was introduced into the culture flasks and cultured as described above. To day 4 after infection, the viral suspension was purified from cell debris within 15 min at 2000 g, 4°C in refrigerator centrifuge (MPW, Poland) [5, 15, 16]. The sucrose (AppliChem, Germany), glycerol (AppliChem) and maltose (Sigma-Aldrich) were introduced into collected supernatant. To store the virus we used the following media: 1 – GM without additives; 2 – GM with 5% sucrose; 3 – GM with 5% glycerol; 4 – with 5% sucrose and 5% glycerol; 5 – with 5% maltose.

Using a variable volume mechanical pipette (Biohit Proline Plus, Finland), by 1 ml of virus suspension in the mentioned protective media were injected into the sterile plastic cryovials (SPL) and stored in a thermostat (Binder) at 37°C; refrigerated chamber (Liebherr, Germany) at 5°C; freezing chamber (National Lab, Germany) at –20 and –80°C; Dewar vessel (Kharkiv Plant of Transport Machinery, Ukraine) at –196°C. The cooling rates down to the specified temperatures were not controlled. An infectious activity of the samples was evaluated before storage, as well as after one week and 3, 6, 12, 18 and 24 months later (observation period).

The studied index was determined by titration in the BHK-21 cell culture in 96-well culture plates (TPP, Switzerland) in five replicates. The cells in plates were cultured in CO₂ incubator at 37°C and 5% CO₂ for 48 hrs, then fixed with cooled at –20°C acetone and stained with specific rabies virus monoclonal antibodies labeled with fluorescein isotiocyanate (Fujirebio, USA). The presence of bright specific green luminescence in each plate well, testified to a cell infection with rabies virus, was observed with laboratory microscope (Leica DM2000, Germany) with a fluorescence module at ×100 [5, 15]. The virus infectious activity was calculated by the Spearman-Kärber method and expressed in lg CCID₅₀ [3, 5, 14].

The efficiency of the virus storage was assessed by virus infectious activity in GM prior to manipulation (control). The effect of temperature regimens on virus storage efficiency was determined. In addition, at each storage period we compared the studied index with that in previous one, and after 24 months we did with that in the additive-free medium at each of temperatures.

The findings were statistically processed using the Statistica 10 software (StatSoft, USA) using the



Ефективність зберігання вірусу оцінювали за інфекційною активністю вірусу в РС до маніпуляцій (контроль). Визначали вплив температурних режимів на ефективність зберігання вірусу. Крім того, на кожному з термінів зберігання досліджуваний показник порівнювали з таким на попередньому терміні, а через 24 місяці – з таким у середовищі без домішок при кожній із температур.

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми «Statistica 10» («StatSoft», США) з використанням методу дисперсійного аналізу (ANOVA): визначали значущість відмінностей між середніми значеннями активності вірусу; оцінювали вплив кожного з факторів на інфекційну активність вірусу. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$ [1].

Результати та обговорення

У зв'язку з тим, що внесення захисних речовин у РС вірусу до поміщення на зберігання значуще не впливало на його активність, вихідним контролем вважали інфекційну активність вірусу в РС до маніпуляцій (далі – вихідна інфекційна активність вірусу), яка становила $(4,68 \pm 0,19) \lg \text{CCID}_{50}$.

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

Після зберігання протягом тижня інфекційна активність вірусу не змінювалася у зразках із сахарозою (-80°C), гліцерином (-80 і -196°C) і сумішшю цих речовин (-196°C) (рис. 1). У інших зразках даний показник знизився. Найбільш високу інфекційну активність вірусу виявлено в зразках після зберігання при -80 і -196°C , найбільш низьку – при 37°C . Протягом 3-х місяців зберігання при 37°C у всіх зразках відбулася повна інактивація вірусу.

В умовах зберігання при 5°C протягом 3-х місяців найбільш високий показник збереженості вірусу відзначено у РС без домішок – 22% від вихідної інфекційної активності, через 6 місяців вірус інактивувався у всіх зразках, крім середовища з сумішшю сахарози та гліцерину, в якому збережено 13% від вихідного показника.

Зміну інфекційної активності штаму CVS у кожному з захисних середовищ протягом 24 місяців (термін спостереження) оцінювали за температур -20 , -80 і -196°C (рис. 2). У РС без

analysis of variance (ANOVA), *i. e.* the significance of differences between the mean values of virus activity was determined; the impact of each factor on virus infectious activity was assessed. The differences were considered significant at $p < 0.05$ [2].

Results and discussion

Due to the fact that the introduction of protective substances into the virus GM prior to be placed for storage did not significantly affect its activity, the virus infectious activity in the GM prior to manipulation (hereinafter referred to as the virus initial infectious activity), was considered as the initial control, which amounted to $(4.68 \pm 0.19) \lg \text{CCID}_{50}$.

The infectious activity of rabies virus CVS strain within 24 months (observation period) of storage was found to be affected by protective medium composition, temperature and storage period. Storage temperature influenced this index mostly and it was less dependent on storage term and protective medium composition.

After one-week storage, the virus infectious activity remained unchanged in the samples with sucrose (-80°C), glycerol (-80 and -196°C) and mixture of these substances (-196°C) (Fig. 1). In the other samples, this viral index was decreased. The highest virus infectious activity was revealed in the samples after storage at -80 and -196°C , and the lowest one was found at 37°C . During 3 months of 37°C storage, the virus was completely inactivated in all the samples.

Under storage at 5°C for 3 months, the highest rate of virus preservation was observed in the additive-free GM: 22% of the initial infectious activity, after 6 months the virus was inactivated in all the samples except the medium with sucrose and glycerol mixture, where 13% of the initial index was preserved.

The change in the CVS strain infectious activity in each of the protective media for 24 months (observation period) was assessed at -20 , -80 , and -196°C (Fig. 2). In the additive-free GM (medium 1) after storage at -20°C for 3 months this index decreased down to 73% (Fig. 3), between 3 and 6 months it remained unchanged, between 6 and 18 months it decreased and remained stable up to 24 months, *i. e.* 53% of the initial value (see Fig. 2). At -80°C , the virus infectious activity decreased during the first 3 months of storage, after 24 months it remained unchanged and made 76% of the initial one. The storage at -196°C resulted in a partial destruction of viral particles and a decrease in the virus infectious activity by 18% at the freezing stage only (see Fig. 1). During the vi-



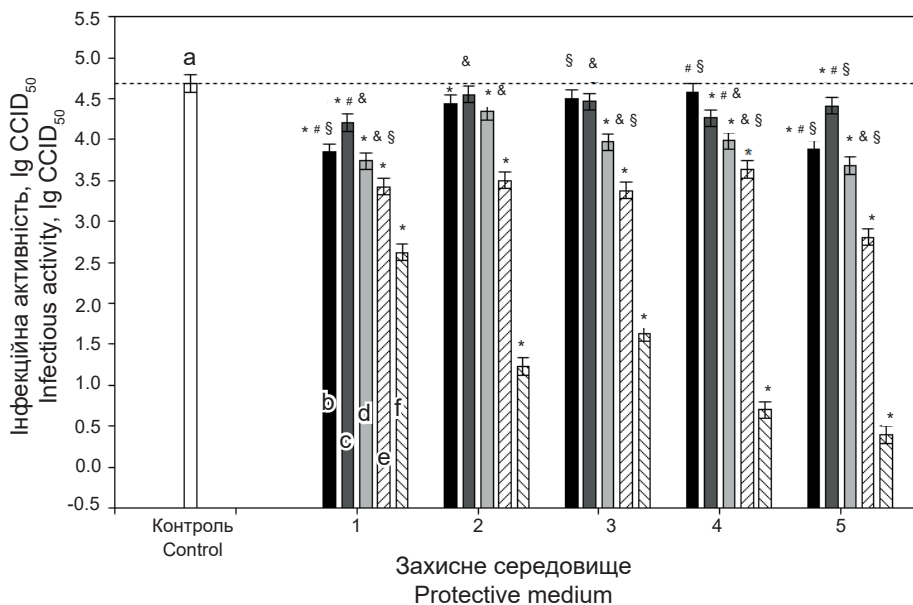


Рис. 1. Інфекційна активність вірусу сказу штаму CVS після заморожування в захисних середовищах і зберігання протягом тижня за різних температур: контроль (а); -196°C (b); -80°C (c); -20°C (d); 5°C (e); 37°C (f); * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем; # – відмінності значущі між температурами -196 та -80°C ; & – відмінності значущі між температурами -80 та -20°C ; § – відмінності статистично значущі між температурами -196 та -20°C ($p < 0,05$; $n = 5$).

Fig. 1. Infectious activity of the rabies virus CVS strain after freezing in protective media and storage for a week at different temperatures: control (a); -196°C (b); -80°C (c); -20°C (d); 5°C (e); 37°C (f); * – differences are significant as compared with the control; # – the differences are significant between -196 and -80°C ; & – differences are significant between -80 and -20°C ; § – difference are significant between -196 and -20°C ($p < 0.05$; $n = 5$).

домішок (середовище 1) після зберігання при -20°C протягом 3-х місяців даний показник знизився до 73% (рис. 3), між 3 і 6 місяцями – не змінювався, 6 і 18 місяцями – знизився і залишався стабільним до 24-х місяців – 53% від вихідного значення (див. рис. 2). За температури -80°C інфекційна активність вірусу знизилася протягом перших 3-х місяців зберігання, через 24 місяці не змінювалася і складала 76% від початкової. Зберігання зразків за -196°C призвело до часткової загибелі вірусних частинок і зниження інфекційної активності вірусу на 18% тільки на етапі заморожування (див. рис. 1). Зберігання штаму вірусу за даних умов протягом 24-х місяців не впливало на його інфекційну активність.

Інфекційна активність вірусу у захисному середовищі з додаванням 5% сахарози (середовище 2) за температури зберігання -20°C протягом перших 3-х місяців знизилася до 82% (рис. 4), з 3-го по 6-й місяць не змінювалася, з 6-го по 24-й місяць знизилася до 37% (див. рис. 2). Динаміка даного показника у середовищі з сахарозою за температур зберігання -80 і

rus strain storage under these conditions within 24 months, its infectious activity remained unchanged.

The virus infectious activity in the protective medium, supplemented with 5% sucrose (medium 2) at a storage temperature of -20°C during the first 3 months decreased down to 82% (Fig. 4), from the 3rd to 6th month remained unchanged, and decreased down to 37% from the 6th to 24th month (see Fig. 2). This index dynamics in the sucrose-contained medium at -80 and -196°C was the same as in the additive-free medium. After 24 months of storage at -80 and -196°C it was 83 and 94%, respectively (see Fig. 2).

After storage of the virus for 3–12 months in GM, supplemented with 5% glycerol (medium 3) at -20°C , its infectious activity reduced, then remained at the same level and 24 months

later made 62% of the initial control (Fig. 2, 5). At -80°C , during the first 6 months it reduced and remained stable up to 24 months, making 80% of the initial control. The temperature of -196°C provided this index stability within the entire observation period at the level of 94% (see Fig. 2).

It was found that in the GM supplemented with 5% sucrose and 5% glycerol (medium 4), the virus infectious activity at -20°C storage temperature decreased within the first 3 months and between 6 and 24 months (Fig. 6). After 24 months at -20°C , 63% of the virus infectious activity were preserved (see Fig. 2). At -80°C , a partial destruction of viral particles occurred at the freezing stage only. During further storage, the studied index remained stable and after 24 months it was 80%. The storage temperature of -196°C preserved the virus initial infectious activity within 18 months, between 18 and 24 months it decreased down to 94% (see Fig. 2).

In the protective medium supplemented with 5% maltose (medium 5) at -20°C storage temperature, the virus infectious activity decreased within 24 months (Fig. 7) and made 8% of the initial one



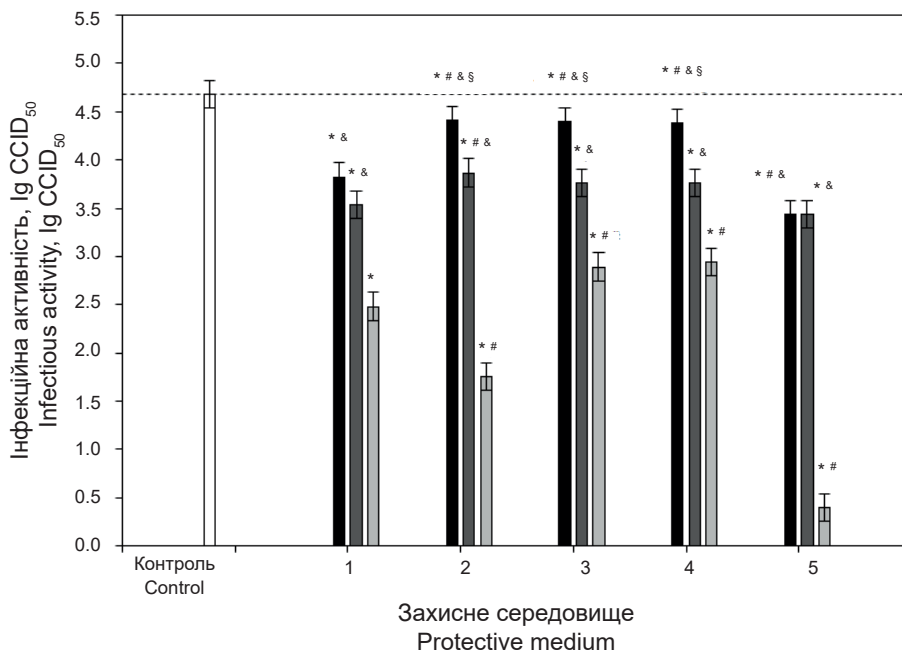


Рис. 2. Інфекційна активність вірусу сказу штаму CVS через 24 місяці зберігання в захисних середовищах за різних температур: контроль (□); -196°C (■); -80°C (■); -20°C (■); * – відмінності статистично значущі у порівнянні з контролем; # – відмінності статистично значущі порівняно з середовищем 1 за кожної з температур; & – інфекційна активність значуще вища, ніж за температури -20°C ; § – інфекційна активність значуще вища, ніж за температури -80°C ($p < 0,05$; $n = 5$).

Fig. 2. Infectious activity of the rabies virus CVS strain after 24 months of storage in protective media at different temperatures: control (□); -196°C (■); -80°C (■); -20°C (■); * – differences are significant as compared with the control; # – differences are significant as compared with medium 1 for each of temperatures; & – infectious activity is significantly higher than at -20°C ; § – infectious activity is significantly higher than at -80°C ($p < 0.05$; $n = 5$).

-196°C була такою, як й в середовищі без домішок. Через 24 місяці зберігання за температури -80°C він складав 83%, за температури -196°C – 94% (див. рис. 2).

Після зберігання вірусу протягом 3–12 місяців у РС із додаванням 5% гліцерину (середовище 3) за температури -20°C його інфекційна активність знизилась, після залишалася на одному рівні, а через 24 місяці складала 62% від вихідного контролю (рис. 2, 5). За температури -80°C протягом перших 6 місяців вона знизилася та залишалася стабільною до 24 місяців і складала 80% від вихідного контролю. Температура -196°C забезпечувала стабільність даного показника протягом всього терміну спостереження на рівні 94% (див. рис. 2).

Встановлено, що в РС із додаванням 5% сахарози і 5% гліцерину (середовище 4) інфекційна активність вірусу за температури зберігання -20°C знижувалася протягом перших 3-х місяців і між 6 і 24-м місяцями (рис. 6). Через 24 місяці при -20°C збереглося 63% інфекційної активності вірусу (див. рис. 2). При -80°C часткова загибель

(see Fig. 2), after 3 months at -80°C it reduced and remained stable until the observation period end, and after 24 months it made 73% of the initial control. During storage at -196°C in the medium with maltose, 17% of viral particles were destroyed at the freezing stage (see Fig. 1). During 12 months, the virus infectious activity remained unchanged, between 12 and 24 months of storage in contrast to all the mentioned above samples, it decreased and made up 73% of the control (see Fig. 2).

Our findings testify to the fact, that the positive temperatures are not suitable for the rabies virus CVS strain long-term storage. The temperature regimen of -20°C and GM-based protective media supplemented with sucrose or the mixture of sucrose and glycerol may be used for operation reasons to store the virus for 6–12 months. Such storage conditions ensure 69–82% preservation of the virus initial infectious activity.

There were provided higher and more stable rates of virus preservation if compared with -20°C by the temperatures of -80 and -196°C , namely 83% of the initial infectious activity at -80°C in the medium with 5% sucrose and 94% at -196°C in the solutions with 5% sucrose and 5% glycerol and their mixture.

It should be noted that the differences in structure of viruses and cells cause no impact on the rabies virus response to freezing conditions and temperature storage regimens, which corresponds to the basic provisions of the two-factor and multi-factor theories of cryoinjuries [12, 19].

Taking into account the fact, that the temperature range from -10 to -80°C corresponds to the crystallization zone of cooled and supercooled water [13], and considering the multicomponent nature of the preservation media and the value of eutectic temperatures for solutions of different electrolytes and cryoprotectants [4], we may assume the following: the virions during storage at -20°C are constantly in a liquid phase in microchannels between



вірусних частинок відбувалася тільки на етапі заморожування. Протягом подальшого зберігання досліджуваній показник залишався стабільним і через 24 місяці становив 80%. Температура зберігання -196°C забезпечувала збереження вихідної інфекційної активності вірусу протягом 18 місяців, між 18 і 24 місяцями вона знизилася до 94% (див. рис. 2).

У захисному середовищі з додаванням 5% мальтози (середовище 5) за температури зберігання -20°C інфекційна активність вірусу знижувалася протягом 24 місяців (рис. 7) і складала 8% від вихідної (див. рис. 2), через 3 місяці при -80°C вона знизилася і залишалася стабільною до кінця терміну спостереження, а через 24 місяці складала 73% від вихідного контролю. У процесі зберігання при -196°C у середовищі з мальтозою 17% вірусних частинок загинули на етапі заморожування (див. рис. 1). Протягом 12 місяців інфекційна активність вірусу не змінювалася, між 12 і 24 місяцями зберігання, на відміну від усіх вищеописаних зразків, вона знизилася і складала 73% від контролю (див. рис. 2).

Отримані результати свідчать про те, що позитивні температури не придатні для тривалого зберігання вірусу сказу штаму CVS. За виробничої необхідності для зберігання вірусу протягом 6–12 місяців можна використовувати температурний режим -20°C і захисні середовища на основі РС із додаванням сахарози або суміші сахарози з гліцерином. Такі умови зберігання забезпечують 69–82% вихідної інфекційної активності вірусу.

Більш високі та стабільні результати збереженості вірусу порівняно з температурою -20°C забезпечують температури -80 і -196°C , а саме: 83% від вихідної інфекційної активності при -80°C у середовищі з 5% сахарози та 94% при -196°C у розчинах із 5% сахарози і 5% гліцерину та їх суміші.

Слід зазначити, що відмінності в будові вірусів і клітин не впливають на реакцію вірусу сказу щодо умов заморожування і температурних режимів зберігання, яка відповідає основним положенням двофакторної і мультифакторної теорій крипошкоджень [4, 14].

Враховуючи, що діапазон температур від -10 до -80°C відповідає зоні кристалізації охолодженої та переохолодженої води [5] і, з огляду на багатокомпонентність середовищ консервування та значення евтектичних температур для розчинів різних електролітів і криопротекторів [2], можна припустити: віріони в процесі зберігання при -20°C постійно перебувають у рідкій фазі в мікроканалах між кристалами льоду і піддаються впливу сукупності факторів (гіперконцентра-

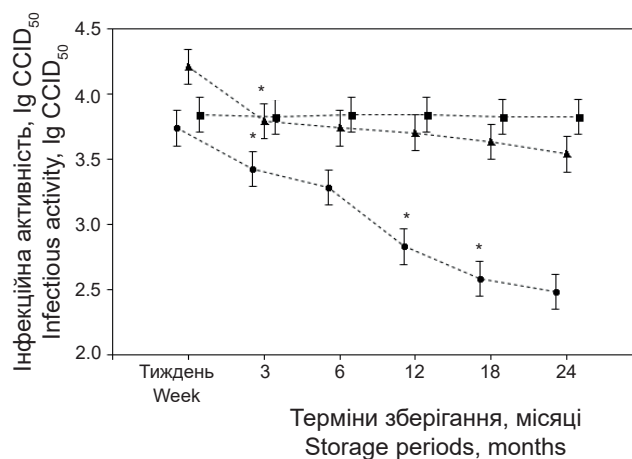


Рис. 3. Інфекційна активність вірусу сказу штаму CVS у ході зберігання у РС без домішок за різних температур: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■); * – відмінності значущі порівняно з попереднім терміном зберігання ($p < 0,05$; $n = 5$).

Fig. 3. Infectious activity of the rabies virus CVS strain during storage in additive-free GM at different temperatures: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■); * – differences are significant as compared with previous storage period ($p < 0.05$; $n = 5$).

ice crystals and exposed to combination of factors (hyperconcentration of salts and other components; change in medium pH; dehydration of macromolecules; disorder of intermolecular interactions ('effect of solutions')) [10, 11]. In addition, under low temperature effect, the loosening and aggregation of nucleocapsid proteins [4] and damage of viral

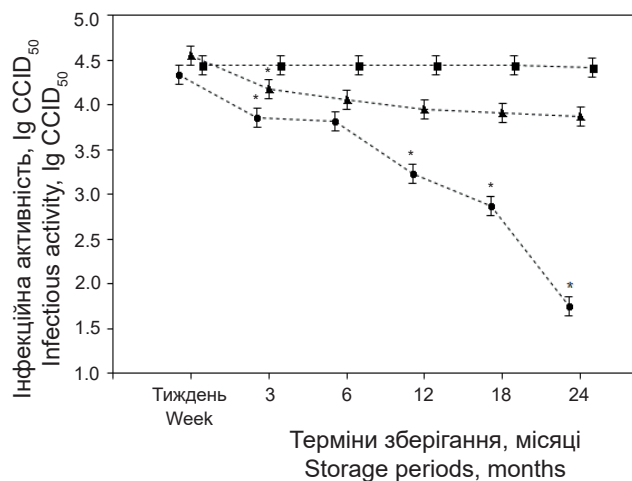


Рис. 4. Інфекційна активність вірусу сказу штаму CVS у ході зберігання у РС з 5% сахарози за різних температур: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■); * – відмінності значущі порівняно з попереднім терміном зберігання ($p < 0,05$; $n = 5$).

Fig. 4. Infectious activity of the rabies virus CVS strain during storage in GM with 5% sucrose at different temperatures: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■); * – differences are significant as compared with previous storage period ($p < 0.05$; $n = 5$).



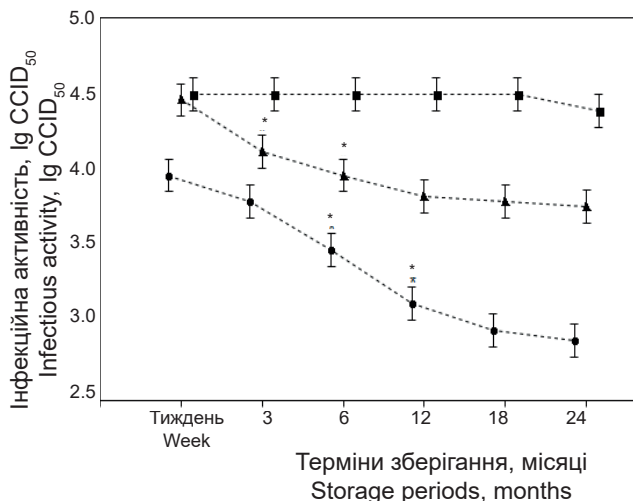


Рис. 5. Інфекційна активність вірусу сказу штаму CVS у ході зберігання у РС з 5% гліцерину за різних температур: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■); * – відмінності значущі порівняно з попереднім терміном зберігання ($p < 0,05$; $n = 5$).

Fig. 5. Infectious activity of the rabies virus CVS strain during storage in GM with 5% glycerol at different temperatures: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■); * – differences are significant as compared with previous storage period ($p < 0.05$; $n = 5$).

ція солей та інших компонентів; зміна рН середовища; дегідратація макромолекул; порушення міжмолекулярних взаємодій («ефект розчинів») [12, 13]. Крім того, під дією низьких температур могли відбуватися розпушення і агрегація білків нуклеокапсиду [2] та пошкодження вірусної РНК-залежної РНК-полімерази. З подовженням термінів зберігання при -20°C відбувалося подальше збільшення кристалів льоду з підвищенням концентрації солей та інших компонентів, що посилювало «ефект розчинів».

Зниження показника інфекційної активності вірусу в процесі зберігання при -80°C (у РС без кріопротекторів та з додаванням 5% сахарози упродовж 3-х місяців, 5% гліцерину протягом 6-ти місяців) підтверджує пролонгацію завершення вторинної кристалізації в мікроканалах протягом декількох місяців після досягнення цієї температури у зазначених багатокомпонентних захисних середовищах. З цим ефектом пов'язане додаткове пошкодження вірусних частинок під впливом концентрованих розчинених речовин.

Результати експериментів (див. рис. 1, 2) вказують на виражену гідратаційну дію введених у РС проникального і непроникального кріопротекторів. На користь цього факту свідчить високий показник інфекційної активності вірусу в середовищах із сахарозою порівняно з таким у середовищі з мальтозою. Відомо, що у сахарози більш висока здатність до зв'язування во-

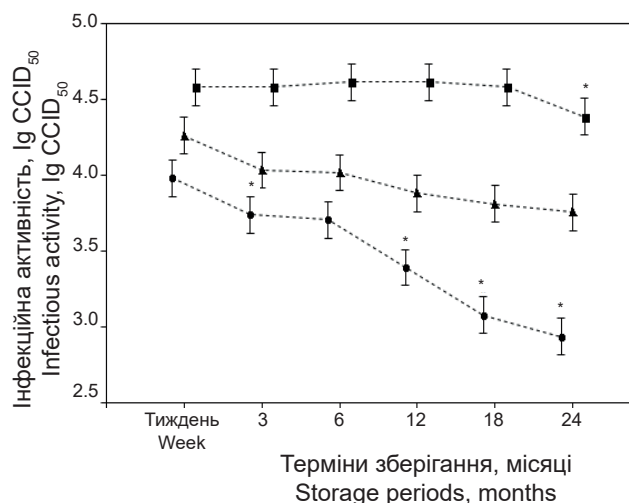


Рис. 6. Інфекційна активність вірусу сказу штаму CVS у ході зберігання у РС з 5% сахарози та 5% гліцерину за різних температур: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■); * – відмінності значущі порівняно з попереднім терміном зберігання ($p < 0,05$; $n = 5$).

Fig. 6. Infectious activity of the rabies virus CVS strain during storage in GM with 5% sucrose and 5% glycerol at different temperatures: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■); * – differences are significant as compared with previous storage period ($p < 0.05$; $n = 5$).

RNA-dependent RNA polymerase, could occur. When extending the storage term at -20°C , a further increase in ice crystals with rise in salt concentration and other components occurred, which increased the 'effect of solutions'.

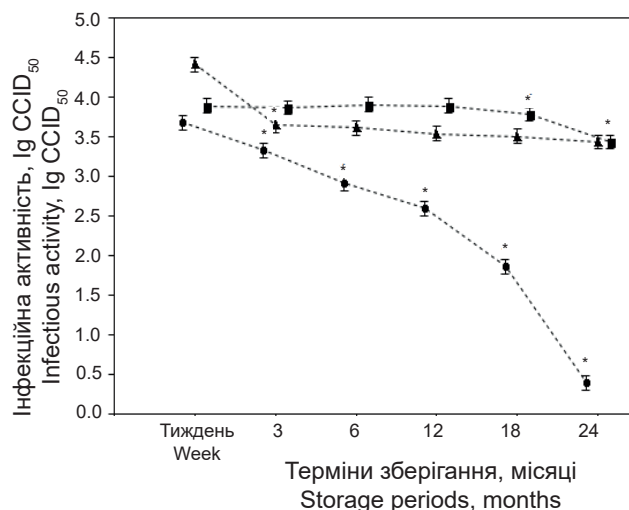


Рис. 7. Інфекційна активність вірусу сказу штаму CVS у ході зберігання у РС з 5% мальтози за різних температур: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■); * – відмінності значущі порівняно з попереднім терміном зберігання ($p < 0,05$; $n = 5$).

Fig. 7. Infectious activity of the rabies virus CVS strain during storage in GM with 5% maltose at different temperatures: -20°C (●); -80°C (▲); -196°C (■); * – differences are significant as compared with previous storage period ($p < 0.05$; $n = 5$).



ди [2]. Крім цього, вивчені захисні середовища на основі DMEM із фетальною сироваткою ВРХ, очевидно, стабілізують капсид і суперкапсид віріонів, про що свідчать результати збереженості вірусу в РС без кріопротекторів.

Відкритим для обговорення та додаткового вивчення залишається вперше встановлений факт зниження інфекційної активності вірусу після зберігання в середовищі з мальтозою при -196°C протягом 12–24 місяців.

Висновки

1. Встановлено, що температурні режими зберігання -80 та -196°C і захисні середовища на основі DMEM забезпечують високу інфекційну активність вірусу сказу штаму CVS протягом 24 місяців (термін спостереження). Найбільш високу збереженість вірусу (83% від вихідного контролю) у процесі зберігання при -80°C забезпечувало середовище на основі DMEM з 0,5% фетальної сироватки ВРХ із додаванням 5% сахарози, при -196°C – на основі РС з додаванням 5% сахарози, 5% гліцерину та суміші 5% сахарози і 5% гліцерину – 94% від початкової інфекційної активності.

2. З огляду на виробничі регламенти та стандартні операційні процедури виробництва антирабійних препаратів, для довгострокового зберігання великих об'ємів вірусу сказу штаму CVS рекомендовано температурний режим -80°C і захисне середовище на основі РС із додаванням 5% сахарози. Для зберігання еталонних зразків і невеликих об'ємів вірусу прийнятні температурні режими -80 та -196°C і захисні середовища на основі РС із додаванням 5% сахарози, 5% гліцерину та суміші 5% сахарози і 5% гліцерину.

3. За виробничої необхідності для зберігання вірусу протягом 6-ти місяців можна використовувати температурний режим -20°C і захисне середовище на основі РС із додаванням 5% сахарози та суміші 5% сахарози і 5% гліцерину.

4. Показано, що кріозахисний ефект РС на основі DMEM із додаванням 0,5% фетальної сироватки ВРХ та середовищ консервування на основі РС із додаванням 5% сахарози, або 5% гліцерину, або 5% мальтози або суміші 5% сахарози і 5% гліцерину обумовлено гідратаційними властивостями та стабілізацією віріонів.

Література

1. Атраментова ЛА, Утевская ОМ. Статистические методы в биологии. Горловка: Ліхтар, 2008. 248 с.
2. Белоус АМ, Грищенко ВИ. Кробиология. Киев: Наукова думка; 1994. 432 с.

A decreased index of the virus infectious activity during storage at -80°C (in GM without cryoprotectants and supplemented with 5% sucrose for 3 months, 5% glycerol for 6 months) confirms the prolongation of completion of secondary crystallization in microchannels within several months after achieving this temperature in the mentioned multicomponent protective media. This effect is associated with extra damage to viral particles under the impact of concentrated solutes.

Our findings (see Figs. 1, 2) demonstrate a pronounced hydration action of penetrating and non-penetrating cryoprotectants, introduced into GM. This fact is evidenced by a high virus infectious activity in sucrose media as compared to that in maltose one. The sucrose is known to have a higher ability to bind water [4]. In addition, the studied DMEM-based protective media with fetal bovine serum apparently stabilize the virion capsid and supercapsid, as evidenced by the results of virus preservation in cryoprotectant-free GM.

The first established fact of a decrease in the virus infectious activity after storage in the medium with maltose at -196°C for 12–24 months has remained open for discussion and further study.

Conclusions

1. The storage temperatures of -80 and -196°C and DMEM-based protective media were established to provide a high infectious activity of the rabies virus CVS strain for 24 months (observation period). The highest rate of virus preservation (83% of the initial control) during storage at -80°C was ensured by the DMEM-based preserving medium with 0.5% fetal bovine serum supplemented with 5% sucrose, at -196°C it was provided by GM-based medium supplemented with 5% sucrose, 5% glycerol and 5% sucrose and 5% glycerol mixtures and made 94% of the initial activity.

2. Surveying the production regulations and the standard operating procedures for the rabies products, a temperature regimen of -80°C and a GM-based protective medium supplemented with 5% sucrose should be recommended for a long-term storage of large volumes of the rabies virus CVS strain. To store the reference samples and small volumes of virus, the temperature regimens of -80 and -196°C and the GM-based protective media supplemented with 5% sucrose, 5% glycerol and 5% sucrose and 5% glycerol a mixtures have been considered to be acceptable.

3. If for the production aims it is needed to store the virus within 6 months, a temperature regimen of -20°C and the GM-based protective medium supplemented with 5% sucrose and the mixture of 5% sucrose and 5% glycerol may be used.



3. 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 01.10.19] Доступно на: <http://www.jbks.ru/archive/issue-9/article-23>.
4. Жегунов ГФ, Нардид ОА, редакторы. Основы криобиологии и криомедицины: учебник для студентов-биологов и медиков. Харьков; 2019. 614 с.
5. Сергеев ГБ, Батюк ВА. Криохимия. Москва: Химия; 1978. 296 с.
6. ATCC. Virology guide. Tips and techniques for propagating virus in tissue culture and embryonated chicken eggs. [Internet]. Manassas: American Type Culture Collection; 2016. 32 p. [Cited 25.09.18] Available from: https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/Virology_Guide.ashx
7. Aubert MFA. Methods for the calculation of titers. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. P. 445–59.
8. Cardoso FMC, Petrovajová D, Horňáková T. Viral vaccine stabilizers: status and trends. Acta Virol. 2017; 61(3): 231–39.
9. Costa EC, Teixeira MFS, Aguiar TDF, et al. Rabies virus viability after short-term cryopreservation using cryoprotectant agents. Rev Inst Adolfo Lutz. 2011; 70: 106–12.
10. Gould EA. Methods for long-term virus preservation. Mol Biotechnol. 1999; 13(1): 57–66.
11. Hooper DC. Rabies virus. In: Detrick B, Schmitz JL, Hamilton RG, editors. Manual of molecular and clinical laboratory immunology. 8th ed. Washington, DC: ASM Press; 2016. P. 665–73.
12. Leibo SP, Mazur P. The role of cooling rates in low-temperature preservation. Cryobiology. 1971; 8(5): 447–52.
13. Mazur P. Causes of injury in frozen and thawed cells. Fed Proc. 1965; 24(1): 175–82.
14. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. Science. 1970, 168(3934): 939–49.
15. Variantsia VV, Vysekantsev IP. Storage methods of complex RNA viruses. Probl Cryobiol Cryomed. 2017; 27(4): 287–95.
16. Variantsia VV, Vysekantsev IP. Infectious activity of L. Pasteur rabies virus vaccine strain frozen-dried in various protective media and then stored at various temperatures. Probl Cryobiol Cryomed. 2018; 28(4): 333–42.
17. World Health Organization 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.
18. World Health Organization. Rabies vaccines: WHO position paper, April 2018 – recommendations. Vaccine. 2018; 36(37): 5500–3.
19. World Health Organization. WHO expert consultation on rabies: third report. Geneva: WHO; 2018. 184 p.

4. It was shown that the cryoprotective effect of the DMEM-based GM supplemented with 0.5% fetal bovine serum and GM-based preserving media supplemented with 5% sucrose or 5% glycerol, or 5% maltose or the 5% sucrose and 5% glycerol mixture was stipulated by hydration properties and virion stabilization.

References

1. ATCC. Virology guide. Tips and techniques for propagating virus in tissue culture and embryonated chicken eggs. [Internet]. Manassas: American Type Culture Collection; 2016. 32 p. [Cited 25.09.18] Available from: https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/Virology_Guide.ashx
2. Atramentova LA, Utevska OM. [Statistical methods in biology]. Horlivka: Likhtar, 2008. 248 p. Russian.
3. Aubert MFA. Methods for the calculation of titers. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. P. 445–59.
4. Belous AM, Grishchenko VI. [Cryobiology]. Kyiv: Naukova dumka; 1994. 432 p. Russian.
5. 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 01.10.19] Available from: <http://www.jbks.ru/archive/issue-9/article-23>. Russian.
6. Cardoso FMC, Petrovajová D, Horňáková T. Viral vaccine stabilizers: status and trends. Acta Virol. 2017; 61(3): 231–39. DOI: 10.4149/av_2017_301
7. Costa EC, Teixeira MFS, Aguiar TDF, et al. Rabies virus viability after short-term cryopreservation using cryoprotectant agents. Rev Inst Adolfo Lutz. 2011; 70: 106–12
8. Gould EA. Methods for long-term virus preservation. Mol Biotechnol. 1999; 13(1): 57–66.
9. Hooper DC. Rabies virus. In: Detrick B, Schmitz JL, Hamilton RG, editors. Manual of molecular and clinical laboratory immunology. 8th ed. Washington, DC: ASM Press; 2016. P. 665–73.
10. Leibo SP, Mazur P. The role of cooling rates in low-temperature preservation. Cryobiology. 1971; 8(5): 447–52.
11. Mazur P. Causes of injury in frozen and thawed cells. Fed Proc. 1965; 24(1): 175–82.
12. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. Science. 1970, 168(3934): 939–49.
13. Sergeev GB, Batiuk VA. [Cryochemistry]. Moscow: Chemistry; 1978. 296 p. Russian.
14. Variantsia VV, Vysekantsev IP. Storage methods of complex RNA viruses. Probl Cryobiol Cryomed. 2017; 27(4): 287–95.
15. Variantsia VV, Vysekantsev IP. Infectious activity of L. Pasteur rabies virus vaccine strain frozen-dried in various protective media and then stored at various temperatures. Probl Cryobiol Cryomed. 2018; 28(4): 333–42.
16. World Health Organization 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.
17. World Health Organization. Rabies vaccines: WHO position paper, April 2018 – recommendations. Vaccine. 2018; 36(37): 5500–3.
18. World Health Organization. WHO expert consultation on rabies: third report. Geneva: WHO; 2018. 184 p.
19. Zhegunov GF, Nardid OA, editors. [Fundamentals of cryobiology and cryomedicine: the textbook for students of biology and medical]. Kharkiv: Brovin AV; 2019. 614 p. Russian.

