

DOI 10.29254/2077-4214-2019-4-1-153-205-211

УДК 578.824.11:57.043:578.22:578.72:615.371

^{1,2}Варяниця В. В., ¹Высеканцев И. П.

ЗАЩИТНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ХРАНЕНИЯ СТАНДАРТНОГО ШТАММА ВИРУСА БЕШЕНСТВА CVS ПРИ ТЕМПЕРАТУРАХ –20, –80°C

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

²ПАО «ФАРМСТАНДАРТ-БИОЛЕК» (г. Харьков)

vvvarianytsia@gmail.com

Связь публикации с плановыми научно-исследовательскими работами. Исследование проведено в рамках выполнения научно-исследовательской работы «Исследование механизмов криоповреждений микроорганизмов, иммобилизованных в гелевых носителях с разными физико-химическими свойствами, во время низкотемпературного хранения и лиофилизации», № государственной регистрации 0118U001187.

Вступление. Бешенство – острый зоонозный вирусный энцефалит, возбудителем которого является сложный РНК-содержащий вирус семейства *Rhabdoviridae* и рода *Lyssavirus*. Бешенство имеет самый высокий коэффициент смертности среди других инфекционных заболеваний. По последним оценкам Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) ежегодно от бешенства, опосредованного собаками, умирает около 59 000 человек. Предотвратить данное заболевание можно только с помощью предэкспозиционной или постэкспозиционной профилактики с применением антирабических вакцин и антирабических иммуноглобулинов [1-9].

Для контроля данных препаратов в ходе их производства применяют реакцию нейтрализации стандартного штамма вируса специфическими антителами *in vivo* и *in vitro*. В соответствии с рекомендациями ВОЗ для этой реакции используют фиксированный стандартный штамм вируса бешенства challenge virus standard (CVS) [2-4,6,10,11]. Неотъемлемой частью рутинного контроля активности антирабических препаратов является хранение данного штамма. При этом большое значение имеет стабильность вирусных препаратов, так как наличие разного количества дефектных вирусных частиц и инактивированного вируса влияет на надежность и воспроизводимость тестов на основе нейтрализации вируса. Это связано с тем, что неинфекционные частицы конкурируют с полными вирионами за связывание антител. Кроме того, эти дефектные частицы ингибируют инфекционную активность неповрежденных вирионов [12,13].

Главными методами хранения большинства вирусов в исследовательских и производственных целях является лиофилизация и замораживание при низких температурах с применением защитных сред [1,5,11-20]. Поскольку после лиофилизации вирус необходимо пассировать, а хранение в жидком азоте в условиях производства ограничено по объему хранения материала, данные методы не применимы в рутинном контроле антирабических препаратов [1,5,13,18]. Исходя из этого, наибольшее распростра-

нение получило хранение вирусов при температурах от –20 до –85°C, для поддержания которых пригодны коммерческие морозильные камеры, позволяющие хранить вирусосодержащий материал в больших объемах [1,11-16,18,19-21].

Чаще всего в качестве основы защитной среды для хранения и транспортировки вирусов используют среду для их культивирования или сбалансированные физиологические растворы солей с добавлением белков и других стабилизирующих веществ [13-16,18]. В качестве защитных белков могут использоваться обезжиренное молоко, желатин, пептон, сыворотка крови позвоночных и ее компоненты [11-16,19-22]. Кроме белков в качестве криопротекторов используют сахарозу, глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО) [1,11-22]. В качестве альтернативы использования желатина для хранения вирусов и живых вирусных вакцин рекомендуют использовать биосовместимые гелеобразующие вещества растительного происхождения, например, альгинат натрия, который также успешно используют в качестве криопротектора для долгосрочного хранения клеток [21,23,24].

Актуальной проблемой биотехнологической промышленности является разработка индивидуальных консервирующих сред для хранения конкретных штаммов вирусов при различных низких температурах, отвечающих условиям производства [11,13,15,18]. Что касается стандартного штамма вируса бешенства CVS, согласно рекомендациям ВОЗ, данный штамм необходимо хранить при температурах –70 или –80 °C в среде на основе буфера с добавлением низких концентраций бычьего сывороточного альбумина [2,4,6,10]. Однако отсутствуют данные о влиянии таких условий на сохранность стандартного штамма при длительном хранении.

Цель исследования – разработка состава консервирующих сред для долгосрочного хранения стандартного штамма вируса бешенства CVS в условиях производства антирабических препаратов при температурах –20 и –80 °C.

Объект и методы исследования. Объектом исследования был контрольный штамм CVS, полученный из Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича (Москва, Россия) и адаптированный к культуре клеток ВНК-21 в ПАО «ФАРМСТАНДАРТ-БИОЛЕК». Штамм задепонирован (свидетельство № 679) в Депозитарии Государственного научно-контрольного института биотехнологии и штаммов микроорганизмов (Киев, Украина).

Вірус культивували в постійній клітинній лінії ВНК-21 (clone 13), отриманій з Європейської колекції клітинних культур (ECACC, Портон-Даун, Великобританія). Ця культура кліток рекомендована ВОЗ, Міжнародним Епізоотическим Бюро і іншими міжнародними організаціями в якості субстрата для отримання стандартного штаму CVS [1,2,4,6,10].

Клітинну лінію ВНК-21 культивували в вигляді пристіночного моношару в течение 1 сутки в стерильних пластикових культуральних флаконах (SPL, Німеччина) в ростовій середі на основі DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) з додаванням 10% (v / v) фетальної бичьей сироватки (Sigma-Aldrich, USA). Культивування проводили в CO₂-інкубаторі (Binder, Німеччина) при 37°C і 5% CO₂. Культуру кліток заражали фіксованим стандартним штамом CVS з інфекційної активністю (5,87 ± 0,16) lg CCID₅₀ (50%-я інфікуюча доза для культури кліток). Експозицію кліток з вірусною суспензією проводили в течение годин в умовах CO₂-інкубатора при 33°C і 5% CO₂. Потім в культуральні флакони вносили ростову середу для вірусу на основі DMEM з додаванням 0,1% (v / v) бичього сироваткового альбуміну (БСА) і культивували вірус в аналогічних вище описаних умовах. Збір вірусної суспензії виробляли на 4-е сутки після зараження і очищали її від клітинного детриту центрифугуванням в рефрижераторній центрифугі (MPW, Польща) при 4°C (2000 g, 15 мин.) [1,4-6,10]. Після отбору супернатанта в нього вносили наступні захисні речовини: сахарозу (AppliChem, Німеччина), гліцерин (AppliChem, Німеччина), ДМСО (AppliChem, Німеччина), желатин (Генезис, Україна), альгінат натрію (Sigma-Aldrich, Німеччина) і пептон (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Індія) в різних концентраціях по об'єму (таблиця).

Вірусну суспензію вказаних захисних серед розливали з допомогою механічного дозатора з перемінним об'ємом (Biohit Proline Plus, Фінляндія) по 1 мл в стерильні пластикові криопробірки (SPL, Німеччина) і поміщали в морозильну камеру (National Lab, Німеччина) для зберігання при -20 і -80°C. Швидкості охолодження до цих температур не контролювали. Оцінку збереженості образ-

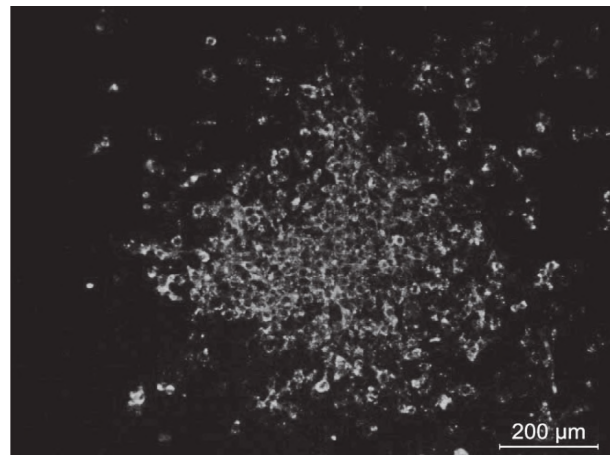


Рисунок 1 – Моношар культури кліток ВНК-21/С13, зараженої вірусом бешенства штаму CVS в розведенні 1:3125. Окрашивание специфічними моноклональними антитілами к вірусу бешенства, меченими ізотіоціанатом флуоресцеїна, ×100.

цов проводили шляхом визначення інфекційної активності перед поміщенням на зберігання, через тиждень і через 1, 3, 6 і 12 місяців зберігання (строк спостереження).

Для визначення інфекційної активності вірусу використовували метод титрації в культурі кліток ВНК-21. Титрацію виконували в 96-луночних культуральних планшетах (TPP, Швейцарія) в 5-ти повторях з коефіцієнтом розведення 5. Клітки в планшетах культивували в умовах CO₂-інкубатора при 37°C і 5% CO₂ в течение 48 годин і фіксували охолодженим при -20°C ацетоном. Для визначення активності вірусу використовували метод прямої флуоресценції. Для цього клітинний моношар окрашивали специфічними моноклональними антитілами к вірусу бешенства, меченими ізотіоціанатом флуоресцеїна (FITC) (Fujirebio, U.S.A.). З допомогою лабораторного мікроскопа (Leica DM2000, Німеччина) з модулем флуоресценції при 100× учитували наявність або відсутність в кожній лунці планшета ярого специфічного свідчення зеленого кольору (рис. 1). Наявність свідчення указувало на зараження кліток вірусом бешенства [1,4,5,10].

Для вирахування інфекційної активності вірусу використовували метод Спірмена-Кербера і виражали в десятичному логарифмі 50%-ї інфікуючої дози для культури кліток (cell culture infectious dose) (lg CCID₅₀):

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

де x_0 – lg оберненого найбільшого розведення, в якому во всіх лунках відзначається позитивне свідчення; d – lg фактора розведення; r_i – кількість лунок з позитивним свідченням в кожному розведенні титрації вірусної суспензії; n_i – загальне кількість лунок для кожного розведення титрації вірусної суспензії [1,5,25].

Для оцінки ефективності консервуючих серед в процесі зберігання вірусу в якості контролю використовували дані по інфекційній активності образців в ростовій середі до маніпуляцій. Також, оцінювали відмінності в ефективності температурних режимів -20 і -80°C. Крім того, через 12 місяців

Таблиця – Состав захисних серед, використаних для зберігання стандартного штаму вірусу бешенства CVS (v/v)

Захисна среда	Состав	Захисна среда	Состав
1	РС*	4/3	РС з 7,5% ДМСО
2/1	РС з 2,5% сахарози	4/4	РС з 10% ДМСО
2/2	РС з 5% сахарози	5/1	РС з 1% желатина
2/3	РС з 7,5% сахарози	5/2	РС з 3% желатина
2/4	РС з 10% сахарози	6/1	РС з 1% альгіната натрію
3/1	РС з 2,5% гліцерина	6/2	РС з 2% альгіната натрію
3/2	РС з 5% гліцерина	6/3	РС з 3% альгіната натрію
3/3	РС з 7,5% гліцерина	7/1	РС з 2,5% пептона
3/4	РС з 10% гліцерина	7/2	РС з 5% пептона
4/1	РС з 2,5% ДМСО	7/3	РС з 7,5% пептона
4/2	РС з 5% ДМСО	7/4	РС з 10% пептона

Примечание. * РС – ростовая среда (DMEM з 0,1% БСА).

хранения результаты сравнивали с инфекционной активностью вируса в среде 1 (ростовая среда без добавок) при каждой из температур хранения. При оценке динамики изменения активности вируса в ходе хранения анализировали значимость изменений активности вируса по сравнению с предыдущим сроком хранения.

Статистический анализ данных осуществляли с помощью стандартных пакетов компьютерных программ Excel (Microsoft, США) и Statistica 10 (StatSoft, США) и методом 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 $p < 0,05$ [26,27].

Результаты исследований и их обсуждение. В ходе изучения сохранности образцов вируса бешенства штамма CVS после хранения в различных защитных средах при температурах -20 и -80°C в течение 12 месяцев (срок наблюдения) оценивали значимость вклада каждого фактора (температура, срок хранения и защитная среда). Установили, что при хранении вируса все факторы в разной степени влияют на изменение инфекционной активности образцов: больший вклад вносит температура хранения, а затем – срок хранения и защитная среда.

Было установлено, что добавление защитных веществ в ростовую среду вируса значимо не влияло на его активность. В связи с этим, в качестве исходного контроля использовали инфекционную активность вируса в ростовой среде до манипуляций (далее – исходная инфекционная активность вируса), которая составила $(6,01 \pm 0,16) \lg \text{CCID}_{50}$.

Выявлено, что после замораживания до -20 и -80°C с неконтролируемыми скоростями охлаждения и хранения при этих температурах в течение недели инфекционная активность снизилась по сравнению с исходным контролем во всех образцах, за исключением образцов с желатином (1 и 3%), замороженных до -80°C (рис. 2). После замораживания до -80°C показатели инфекционной активности вируса в образцах с ростовой средой без добавок, с сахарозой (10%), глицерином (7,5–10%), ДМСО (2,5–5%), желатином, альгинатом натрия (2%) и пептоном (2,5–10%) превышали сохранность вируса, замороженного до -20°C в аналогичных средах консервирования.

Через 12 месяцев при -20°C в ростовой среде без добавок сохранилось 66% от исходной инфекционной активности вируса. В образцах с 5–10% сахарозы, 3% желатина и 5–7,5% глицерина инфекционная активность вируса была достоверно выше, соответственно, 73–74, 71 и 69% от исходного контроля. В образцах с 2,5% сахарозы, 2,5 и 10% глицерина и 5–7,5% ДМСО показатели сохранности вируса достоверно

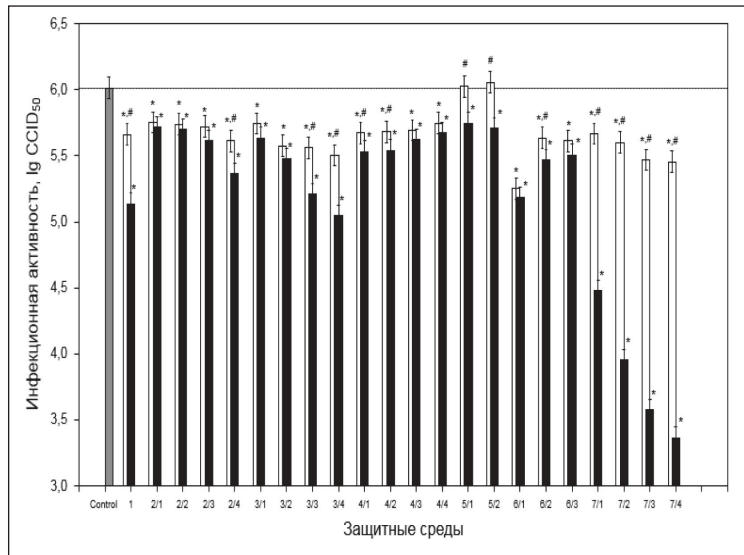


Рисунок 2 – Инфекционная активность стандартного штамма вируса бешенства CVS после замораживания в различных защитных средах и недельного хранения: □ – при -80°C ; ■ – при -20°C ; ■ – контроль; * – различия статистически значимы по сравнению с контролем; # – инфекционная активность после замораживания при -80°C статистически значимо выше, чем при -20°C ($p < 0,05$; $n = 5$).

но не отличались от показателей сохранности вируса в ростовой среде без добавок – 67, 66–67, 65–66%, соответственно. В остальных образцах (с добавлением 2,5 и 10% ДМСО, 1% желатина, альгината натрия и пептона) инфекционная активность вируса была ниже, чем в ростовой среде без добавок. Минимальные показатели инфекционной активности вируса были в среде с пептоном – 10–19%. Наряду с этим, при -80°C через 12 месяцев ростовая среда без добавок обеспечила сохранность 80% от исходной активности вируса. Достоверно более высокие показатели сохранности обеспечивали только образцы с 5–10% сахарозы – 82–86% от исходной активности вируса. В препаратах с 2,5% сахарозы, глицерином, 2,5–7,5% ДМСО и желатином показатели сохранности вируса достоверно не отличались от ростовой среды без добавок и составили, соответственно, 81, 79–81, 80–81 и 80–82% от исходного контроля. В остальных средах

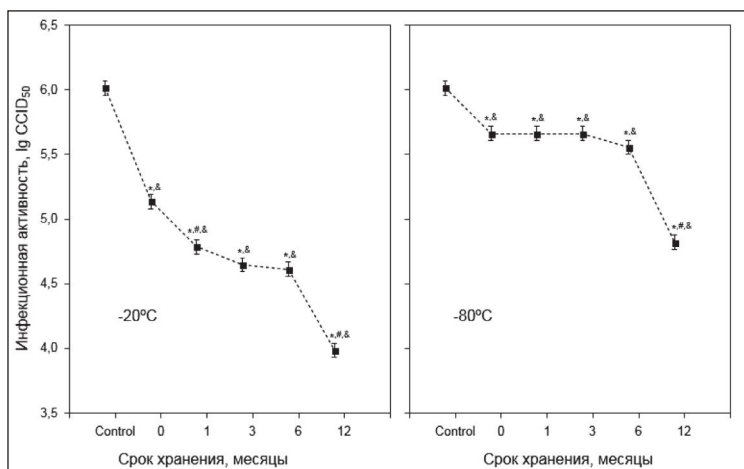


Рисунок 3 – Динамика изменения инфекционной активности стандартного штамма вируса бешенства CVS в ходе хранения при температурах -20 и -80°C в ростовой среде без добавок; * – различия статистически значимы по сравнению с контролем; # – различия статистически значимы по сравнению с предыдущим сроком хранения; & – различия между инфекционной активностью после хранения при -20 и -80°C статистически значимы ($p < 0,05$; $n = 5$).

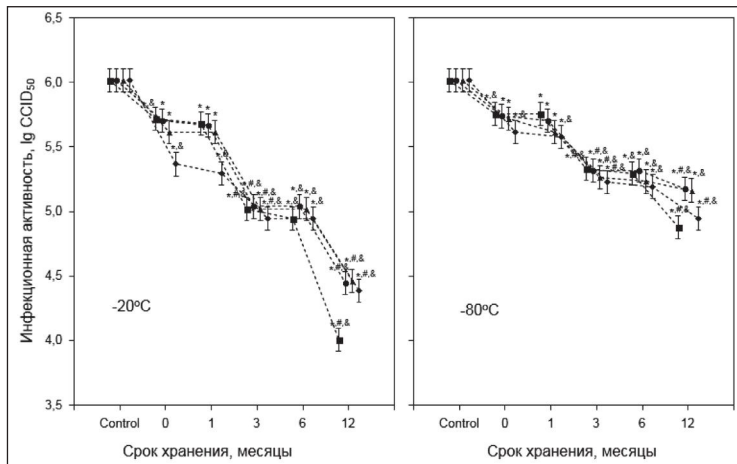


Рисунок 4 – Динамика изменения инфекционной активности стандартного штамма вируса бешенства CVS в ходе хранения при температурах -20°C и -80°C в защитных средах с сахарозой; ■ – 2,5%; ● – 5%; ▲ – 7,5%; ◆ – 10%; * – различия статистически значимы по сравнению с контролем; # – различия статистически значимы по сравнению с предыдущим сроком хранения; & – различия между инфекционной активностью после хранения при -20°C и -80°C статистически значимы ($p < 0,05$; $n = 5$).

(с 10% ДМСО, альгинатом натрия и пептоном) инфекционная активность вируса была достоверно ниже, чем в образцах с ростовой средой без добавок, и составила 77, 69 и 65–72%, соответственно. Следует отметить, что в промежутке между 1 и 12 месяцами хранения показатели инфекционной активности вируса при -80°C значимо превышали инфекционную активность вируса, хранившегося при -20°C .

Для понимания механизмов криопротективного действия использованных в исследовании криопротекторов был проведен анализ динамики изменения инфекционной активности вируса в процессе хранения при температурах -20°C и -80°C . Были выбраны консервирующие среды с наиболее высокими показателями через 12 месяцев.

В ходе хранения вируса в ростовой среде без добавок при -20°C статистически значимое снижение его активности происходило в течение первого месяца после охлаждения до -20°C , а также между 6 и 12 месяцами хранения (рис. 3). При -80°C активность

вируса была стабильной до 6 месяца хранения, а в дальнейшем снижалась.

В свою очередь, в средах, содержащих сахарозу, снижение инфекционной активности при обеих температурах хранения происходило в течение первых трех месяцев (рис. 4). Между 3 и 6 месяцами инфекционная активность вируса не изменялась. А промежутке между 6 и 12 месяцами произошло дальнейшее снижение его инфекционной активности.

В консервирующих средах с глицерином и ДМСО динамика изменения сохранности вируса в ходе хранения была аналогична образцам с сахарозой. Снижение инфекционной активности происходило до первых 3 месяцев и между 6 и 12 месяцами хранения.

Динамика изменения сохранности вируса бешенства штамма CVS в защитных средах с желатином в разных концентрациях при температурах -20°C и -80°C была различной (рис. 5). В образцах с обеими концентрациями желатина при -20°C и с 1% желатина при -80°C инфекционная активность вируса снижалась между 1 и 3 месяцами хранения, в период между 3 и 6 – не изменялась и начинала снижаться между 6 и 12 месяцами. В защитной среде с 3% желатина при температуре -80°C инфекционная активность вируса оставалась стабильной до 6 месяцев хранения, после чего начала снижаться.

Большинство исследований, посвященных изучению механизмов криоповреждения и криозащиты биологических объектов, проведены на клетках различного уровня организации. Общепринято, что защитные эффекты криопротективных веществ связаны с их гидратационными свойствами и, как следствие, способностью влиять на динамику внеклеточного и внутриклеточного кристаллообразования льда и процессами транспорта воды через клеточную мембрану [28]. В соответствии с этими положениями криопротекторы делят на две группы – экстрацеллюлярные и эндоцеллюлярные.

При хранении вирусов в различных зонах низких температур гидратационные свойства криопротекторов также играют существенную роль. Они связывают воду в замораживаемом образце, что в сочетании с многокомпонентностью ростовой среды приводит к расширению эвтектической зоны, вследствие чего вторичная кристаллизация воды и солевых растворов может быть значительно увеличенной по температурной шкале. Кроме способности изменять процессы кристаллизации защитное действие криопротекторов может быть связано и с другими механизмами – способностью предотвращать структурные перестройки белковых макромолекул путем стабилизации системы водородных связей или за счет сорбции на поверхности вирионов со стабилизацией суперкапсида.

Снижение инфекционной активности вируса в процессе хранения при температурах -20°C и -80°C обусловлено неполной

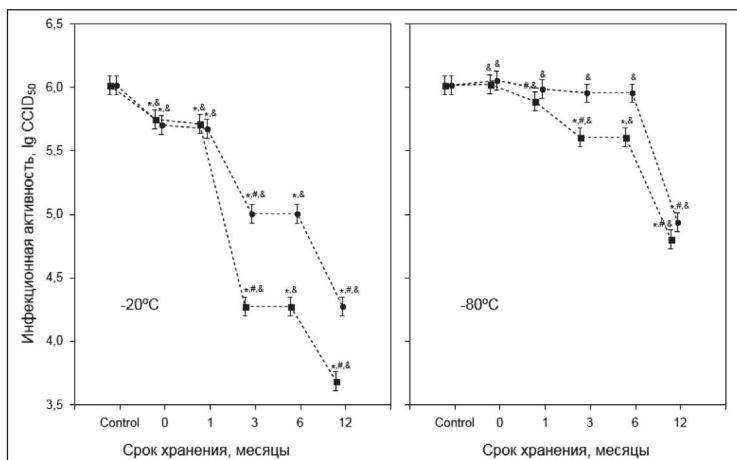


Рисунок 5 – Динамика изменения инфекционной активности стандартного штамма вируса бешенства CVS в ходе хранения при температурах -20°C и -80°C в защитных средах с желатином; ■ – 1%; ● – 3%; * – различия статистически значимы по сравнению с контролем; # – различия статистически значимы по сравнению с предыдущим сроком хранения; & – различия между инфекционной активностью после хранения при -20°C и -80°C статистически значимы ($p < 0,05$; $n = 5$).

кристаллизацией образцов с формированием при 20°C между кристаллами льда каналов с гиперконцентрированными растворами электролитов, находящихся в жидкой фазе. На протяжении года (срок наблюдения) вирионы подвергались воздействию физико-химических факторов, связанных с низкой температурой и наличием указанных гиперконцентрированных растворов электролитов («эффект растворов»). Вследствие этого происходили или гибель вирионов, или накопление криповреждений вирионов, которые вызывали инактивацию вируса на этапе оттаивания [29].

Выводы

1. Установлено, что после хранения при температуре –80°C в течение года (срок наблюдения) показатели инфекционной активности вируса бешенства штамма CVS превышают показатели сохранности вируса при температуре –20°C. Наиболее высокую сохранность вируса в процессе хранения при темпе-

ратурах –20 и –80°C обеспечивали консервирующие среды на основе ростовой среды (DMEM с 0,1% БСА) без добавок и с добавлением сахарозы, глицерина, ДМСО и желатина.

2. Для долгосрочного хранения стандартного штамма вируса бешенства CVS в условиях производства антирабических препаратов рекомендована защитная среда на основе ростовой среды вируса с добавлением сахарозы (5–7,5%) и температура хранения –80°C.

Перспективы дальнейших исследований. Дальнейшие исследования будут посвящены изучению влияния смеси криопротекторов с различным механизмом действия на сохранность стандартного штамма вируса бешенства CVS. Повышение сохранности данного штамма при долгосрочном хранении позволит повысить надежность и воспроизводимость тестов на основе нейтрализации вируса.

Литература

- Burkova VV, Vysekantsev IP, Lavrik AA. Sokhrannost infektsionnoi aktivnosti promyshlennykh shtammov virusa beshenstva khranivshikhsia pri razlichnykh temperaturakh. Zhivye i biokosnye sistemy [Internet]. 2014;9:1-11. [Cited 01.10.19]. Dostupno: <http://www.jbks.ru/archive/issue-9/article-23> [in Russian].
- 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.
- Singh R, Singh KP, Cherian S, Saminathan M, Kapoor S, Manjunatha Reddy GB, et al. Rabies – epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. Veterinary Quarterly. 2017;37(1):212-51. DOI: 10.1080/01652176.2017.1343516
- Trimarchi CV, Rudd RD, Safford JrM. An in vitro virus neutralization test for rabies antibody. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 193-9.
- Varianytsia VV, Vysekantsev IP. Infectious Activity of L. Pasteur Rabies Virus Vaccine Strain Frozen-Dried in Various Protective Media And Then Stored at Various Temperatures. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2018;28(4):333-42. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo28.04.333>
- 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: World Health Organization; 2007. p. 83-132. Cited in: PubMed; PMID: 18314862.
- World Health Organization. Rabies vaccines: WHO position paper, April 2018 – recommendations. Vaccine. 2018;36(37):5500-3. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.06.061
- World Health Organization. WHO expert consultation on rabies: third report. Geneva: World Health Organization; 2018. 184 p.
- Yousaf MZ, Qasim M, Zia S, Khan Mu, Ashfaq UA, Khan S. Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment. Virology Journal. 2012;9(1):1-5. DOI: 10.1186/1743-422X-9-50
- Smith JS. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 181-9.
- Costa EC, Teixeira MFS, Aguiar TDF, Rolim BN, Romijn PC, Rocha MFG. Rabies virus viability after short-term cryopreservation using cryoprotectant agents. Revista do Instituto Adolfo Lutz. 2011;70:106-12.
- Gupta CK, Leszczynski J, Gupta RK, Siber GR. Stabilization of respiratory syncytial virus (RSV) against thermal inactivation and freeze-thaw cycles for development and control of RSV vaccines and immune globulin. Vaccine. 1996;14(15):1417-20. DOI: 10.1016/s0264-410x(96)00096-5
- Varianytsia VV, Vysekantsev IP. Storage methods of complex RNA viruses. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2017;27(4):287-95. DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo27.04.287>
- Johnson FB. Transport of viral specimens. Clinical Microbiology Reviews. 1990;3(2):120-31. DOI: 10.1128/cmr.3.2.120
- Tedeschi R, De Paoli P. Collection and preservation of frozen microorganisms. Methods in Molecular Biology. 2011;675:313-26. DOI: 10.1007/978-1-59745-423-0_18
- Alonso S. Novel preservation techniques for microbial cultures. In: Ojha K, Tiwari B, editors. Novel Food Fermentation Technologies. Food Engineering Series. Cham: Springer; 2016. Chapter 2; p. 7-33. DOI: 10.1007/978-3-319-42457-6_2
- Pegg DE. Principles of cryopreservation. Methods in Molecular Biology. 2015;1257:3-19. DOI: 10.1007/978-1-4939-2193-5_1
- Gould EA. Methods for long-term virus preservation. Molecular Biotechnology. 1999;13(1):57-66. DOI: 10.1385/MB:13:1:57
- 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
- Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology. 2003;46(3):205-29. Cited in: PubMed; PMID: 12818211.
- Chun BH, Lee YK, Lee BC, Chung N. Development of a varicella virus vaccine stabilizer containing no animal8-derived component. Biotechnology Letters. 2004;26(10):807-12.
- Cardoso FMC, Petrovajová D, Horňáková T. Viral vaccine stabilizers: status and trends. Acta Virologica. 2017;61(3):231-9. DOI: 10.4149/av_2017_301
- Liu G, Li S, Yuan H, Hao M, Wurihan, Yun Z, et al. Effect of sodium alginate on mouse ovary vitrification. Theriogenology. 2018;113:78-4. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.02.006
- Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. Progress in Polymer Science. 2012 Jan;37(1):106-26. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003
- 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.
- Rokickij PF. Biologicheskaja statistika. Minsk: Vysshaja shkola; 1973. 320 s. [in Russian].
- Atramentova LA, Utevskaia OM. Statisticheskie metody v biologii. Gorlovka: Likhtar; 2008. 248 s. [in Russian].
- Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. Science. 1970;168(3934):939-49. Cited in: PubMed; PMID: 5462399.
- Belous AM, Grishchenko VI. Kriobiologija. Kiev: Naukova dumka; 1994. 432 s. [in Russian].

ЗАХИСНІ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЗБЕРІГАННЯ СТАНДАРТНОГО ШТАМУ ВІРУСУ СКАЗУ CVS ЗА ТЕМПЕРАТУР –20, –80°C

Варяниця В. В., Висеканцев І. П.

Резюме. В роботі досліджували різні склади консервуючих середовищ для довгострокового зберігання за температур –20 та –80°C стандартного штаму вірусу сказу CVS, який використовується у виробництві для контролю антирабійних препаратів. Показники інфекційної активності вірусу, що зберігався при –80°C, були статистично значуще вище, ніж в зразках, що зберігалися при –20°C. В процесі зберігання за даних температур протягом року (термін спостереження) найбільш високі показники збереження вірусу сказу штаму CVS забезпечували консервуючі середовища на основі ростового середовища без добавок і з додаванням сахарози, гліцерину, ДМСО і желатину. З огляду на те, що значущу ефективність у порівнянні з середовищем без добавок при –80°C показало тільки середовище з додаванням сахарози, для довгострокового зберігання стандартного штаму вірусу сказу CVS в умовах виробництва антирабійних препаратів рекомендовано захисне середовище на основі ростового середовища вірусу з додаванням сахарози (5–7,5%) і температура зберігання –80°C.

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

ЗАЩИТНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ХРАНЕНИЯ СТАНДАРТНОГО ШТАММА ВИРУСА БЕШЕНСТВА CVS ПРИ ТЕМПЕРАТУРАХ –20, –80°C

Варяница В. В., Высеканцев И. П.

Резюме. В работе исследовали различные составы консервирующих сред для долгосрочного хранения при температурах –20 и –80°C стандартного штамма вируса бешенства CVS, который используется в производстве для контроля антирабических препаратов. Показатели инфекционной активности вируса, хранившегося при –80°C, были статистически значимо выше, чем в образцах, хранившихся при –20°C. В процессе хранения при данных температурах в течение года (срок наблюдения) наиболее высокие показатели сохранности вируса бешенства штамма CVS обеспечивали консервирующие среды на основе ростовой среды без добавок и с добавлением сахарозы, глицерина, ДМСО и желатина. Учитывая то, что значимую эффективность по сравнению со средой без добавок при –80°C показала только среда с добавлением сахарозы, для долгосрочного хранения стандартного штамма вируса бешенства CVS в условиях производства антирабических препаратов рекомендована защитная среда на основе ростовой среды вируса с добавлением сахарозы (5–7,5%) и температура хранения –80°C.

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

PROTECTIVE MEDIA FOR STORAGE OF THE RABIES VIRUS STANDARD STRAIN CVS AT TEMPERATURES OF –20, –80°C

Varianytsia V. V., Vysekantsev I. P.

Abstract. We studied various compositions of preserving media for long-term storage at the temperatures of –20 and –80°C of the rabies virus standard strain CVS, which is used for control in manufacture of rabies biologicals.

The virus was accumulated in cell culture of BHK-21 (clone 13) in the growth medium based on DMEM culture medium supplemented with 0.1% (v / v) BSA. Sucrose, glycerol, DMSO, gelatin, sodium alginate and peptone in various concentrations by volume were added to the viral suspension. The resulting samples were placed in freezers for storage at –20 and –80°C. The cooling rates to these temperatures were not controlled. Assessment of the samples safety was carried out by determining the infectious activity before storage, after a week and after 1, 3, 6 and 12 months of storage (observation period). To determine the infectious activity of the virus, the titration method in cell culture of BHK-21 was used. The cell monolayer was stained with specific rabies monoclonal antibodies labeled with fluorescein isothiocyanate and counted using a laboratory microscope with a fluorescence module. The virus infectious activity value was calculated using Spearman-Kärber' method and expressed in decimal logarithm of 50% cell culture infectious dose (lg CCID₅₀).

As the initial control, the infectious activity of the virus in the growth medium before manipulations (hereinafter, the initial infectious activity of the virus) was used. It was amounted to (6,01 ± 0,16) lg CCID₅₀. It was established that after storage at the temperature of –80°C for a year (observation period), the indicators of the infectious activity of the rabies virus CVS strain exceed the virus safety values at the temperature of –20°C. During storage at these temperatures for a year (observation period), the highest safety indices of the rabies virus CVS strain were provided by preserving media based on growth medium (DMEM with 0.1% BSA) without additives and with the addition of sucrose, glycerol, DMSO and gelatin.

In preserving media with sucrose, glycerol and DMSO, the dynamics of the virus preservation during storage was the same. The decrease in infectious activity occurred until the first 3 months and between 6 and 12 months of storage.

After 12 months at –20°C, 66% of the initial infectious activity of the virus remained in the growth medium without additives. In samples with 5–10% sucrose, 3% gelatin, and 5–7.5% glycerol, the infectious activity of the virus was significantly higher than in the growth medium without additives. It was 73–74, 71, and 69% of the initial control, respectively.

Along with this, at –80°C after 12 months, the growth medium without additives ensured safety of 80% of the initial activity of the virus. Significantly higher safety indices were provided only by samples with 5–10% sucrose. It

was 82–86% of the initial virus activity. The minimum indicators of the virus infectious activity at both temperatures were in media with sodium alginate and peptone.

Taking into account that only sucrose-supplemented medium showed significant efficacy compared to the medium without additives at -80°C , the protective medium based on the virus growth medium with the addition of sucrose was recommended for long-term storage of the rabies virus standard strain CVS in manufacture of rabies biologicals (5–7.5%) and storage temperature of -80°C .

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

*Рецензент – проф. Лобань Г. А.
Стаття надійшла 02.10.2019 року*

DOI 10.29254/2077-4214-2019-4-1-153-211-213

УДК 57.083.1:57.086.132:579.861.2:57.083.182

Перетятко О. Г., Ягнюк Ю. А., Скляр Н. І., Крестецька С. Л., Большакова Г. М.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ТА ВІДПОВІДНОСТІ ТАКСОНОМІЧНОМУ ПОЛОЖЕННЮ ЛІОФІЛІЗОВАНИХ КУЛЬТУР МУЗЕЙНИХ ШТАМІВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (м. Харків)

lazamimus@ukr.net

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота є фрагментом фундаментальної НДР «Дослідження закономірностей еволюції антибіотикорезистентності у найпоширеніших різновидів збудників гнійно-запальних інфекцій», № державної реєстрації 0118U004052.

Вступ. Музей мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН» має одну з найбільших та найстаріших у Європі колекцій мікроорганізмів, яка існує з часу створення Інституту (з травня 1886 року). Колекція постійно поповнюється штамми, серед яких збудники нових та маловивчених інфекцій з авторських колекцій співробітників Інституту та зарубіжних наукових установ (США, Франції, Чехії, Бельгії, Швеції, Німеччини та ін.). В колекційному фонді музею зберігаються мікроорганізми III-IV груп патогенності, вилучені в різні історичні періоди починаючи з кінця XIX століття. Серед них є типові, еталонні, виробничі, контрольні та актуальні штамми. Колекція являє собою унікальний ресурс для виконання фундаментальних досліджень і дає широке поле діяльності для порівняння біологічних властивостей історичних та сучасних штамів, у тому числі, для вивчення еволюції мікроорганізмів.

Основним критерієм якості способів тривалого зберігання мікроорганізмів у колекціях є можливість відновлення їх життєздатності та стабільність їх морфологічних, фізіологічних та генетичних властивостей [1,2]. Відомо, що ліофілізація дозволяє підтримувати штамми колекційного фонду без втрати життєздатності тривалий час (понад 50 років) [3-6], проте роботи з вивчення ефективності консервації мікроорганізмів різних видів вкрай важливі, оскільки дозволяють вносити суттєвий теоретичний та практичний вклад в збереження видового різноманіття мікрофлори [7].

Мета дослідження. Оцінка ефективності ліофілізації *S. aureus*, як методу їх довготривалого збереження. Перевірка життєздатності та відповідності таксономічному положенню музейних штамів стафілококів, що тривалий час зберігались у колекції Музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН».

Об'єкт і методи дослідження. У дослідженні використано 25 ліофілізованих зразків 23-х штамів *S. aureus*, виділених у період з 1930 по 1986 роки. Штами зберігались у ліофілізованій формі від 17 до 62 років.

Ліофілізовані культури відновлювали шляхом розчинення вмісту ампули 1,0 мл поживного бульйону та висіву мікробної суспензії з десятикратних розведень на агаризоване середовище (кров'яний агар). Життєздатність визначали за методом Коха [8]. Реідентифікацію мікробних культур проводили з використанням API системи виробництва «Bio-Merieux», Франція (ID 32 STAPH). Фенотипову внутрішньоштамову гетерогенність популяції оцінювали за показником індексу дисоціації, який відображує частку (%) певних форм колоній (S-, R-, D- форм) відносно загальної їх кількості. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою методів параметричної статистики з використанням комп'ютерних програм Microsoft Excel 2007, STATISTICA 6.0. Встановлення взаємозв'язків між змінними проводили за допомогою кореляційного аналізу [9].

Результати досліджень та їх обговорення. Серед взятих у дослід 25 ліофілізованих культур *S. aureus* відновлено життєздатність (92,0±5,4) % зразків. Не вдалось рекультивувати два зразки штаму *S. aureus* 75 (16553) 1971 року ліофілізації, але зазначений штам 1972 року ліофілізації було успішно відновлено. Таким чином, для подальших досліджень відібрано 23 штамми *S. aureus*. Встановлено, що кількість життєздатних клітин у відновлених штамів варіювала у межах від 10^3 до 10^9 КУО/мл. З урахуванням того, що при відновленні ліофілізованих зразків використовують мікробні суспензії з вмістом мікроорганізмів не менш ніж 10^9 КУО/мл, середній показник виживання досліджених штамів складав (7,19±5,4) %.

Стовідсоткове виживання, що відповідає кількості життєздатних клітин 10^9 КУО/мл, виявлено у 2 (8,7±5,9) % штамів, це штамми *S. aureus* 201 (16562) і *S. aureus* 456 (16571) 1967 та 1972 років ліофілізації відповідно. Найменший показник виживання – 0,0001 %, встановлено у 3 (13,0±7,0) % штамів – *S. aureus* ІФ-3 (16570) 1969 року ліофілізації та *S. aureus* ВЛ (16576) і *S. aureus* 906 (16577) 2001 року ліофілізації. У переважної більшості штамів показники виживання коливались у межах від 0,5 % до 10,0 %. Кореляційної залежності між кількістю КУО та терміном зберігання зразка не виявлено ($r=0$). Так, кількісний показник життєздатності штамів *S. aureus* 201 (16562), виділе-