

Лиофилизация и последующее хранение штамма фиксированного вируса бешенства L. Pasteur

В.В. Варяница^{1,2}, И.П. Высеканцев¹

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²ПАО «Фармстандарт-Биолек», г. Харьков, Украина

Freeze-Drying and Subsequent Storage of Fixed Pasteur Strain Rabies Virus

V.V. Varyantsia^{1,2}, I.P. Vysekantsev²

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

²PJSC 'Pharmstandard-Biolik', Kharkiv, Ukraine

Необходимым технологическим требованием при производстве антирабической вакцины является наличие главного и рабочего банков промышленных штаммов вируса бешенства. В мировой практике для хранения вирусов наиболее часто используют лиофилизацию.

Цель работы – изучение сохранности вируса бешенства после лиофилизации в различных защитных средах и в ходе последующего хранения при разных температурах.

Объектом исследования был штамм фиксированного вируса бешенства L. Pasteur. К суспензии вируса в ростовую среду вносили желатин и сахарозу в следующих концентрациях по объему: 3% желатина и 5% сахарозы; 1% желатина и 5% сахарозы; 5% сахарозы; 10% сахарозы. Образцы разливали в стерильные стеклянные флаконы по 1 мл и лиофилизировали, после чего их хранили при 5, –20, –80°C. Сохранность образцов вируса оценивали перед хранением (контроль) и через 6, 12 и 18 месяцев (сроки наблюдения). Для оценки сохранности использовали следующие показатели: внешний вид (визуально), время растворения, инфекционная активность (50%-я инфицирующая доза для культуры клеток ВНК-21 – CCID₅₀).

Установлено, что используемые концентрации желатина и сахарозы в защитной среде обеспечивают разную степень защиты вируса во время лиофилизации и последующего хранения. В процессе лиофилизации вируса наиболее выраженное защитное действие оказывала среда, содержащая 1% желатина и 5% сахарозы. При этом инфекционная активность вируса снизилась на 0,47 lg CCID₅₀. Данная среда также показала значимый защитный эффект и в ходе хранения вируса. После 12 месяцев хранения образцов при –20 и –80°C статистически значимого снижения инфекционной активности вируса по сравнению с контролем выявлено не было. В образцах, хранившихся при 5°C, отмечено значимое уменьшение количества жизнеспособных вирионов. После 18 месяцев хранения (последний срок наблюдения) образцов при температуре –80°C в среде с 1% желатина и 5% сахарозы наблюдалась максимальная сохранность вируса. Данная защитная среда показала лучшие результаты также и при оценке внешнего вида образцов и их растворимости.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о целесообразности применения лиофилизации для формирования и пополнения банка промышленными штаммами вируса в условиях производства антирабической вакцины. Для долгосрочного хранения лиофилизированного вируса рекомендована температура хранения –80°C в ростовой среде с добавлением 1% желатина и 5% сахарозы.

The mandatory technological requirement for producing the antirabies vaccine is the support of master and operating banks of industrial rabies virus strains. Freeze-drying is most often used in the world practice for the rabies virus samples long-term storage as technological and effective method of their preservation.

The research aim was to examine the rabies virus integrity after freeze-drying in various protective media and during subsequent storage at different temperatures.

The research object was the fixed rabies virus strain L. Pasteur. Gelatin and sucrose were added to the viral suspension in various concentrations (vol/vol): 3% gelatin and 5% sucrose; 1% gelatin and 5% sucrose; 5% sucrose; 10% sucrose. The samples were poured into sterile glass vials of 1 ml, freeze-dried and then placed for storage at 5, –20, and –80°C. The integrity evaluation of the virus samples was carried out before storage (the control) and in 6, 12 and 18 months (observation terms). Following parameters were used for the integrity evaluation: appearance (visually), dissolving time, infectious activity (50% Ig CCID₅₀).

It has been found that the used concentrations of gelatin and sucrose in a protective medium provided different virus protection during freeze-drying and subsequent storage.

During virus freeze-drying the most pronounced protective effect was provided by the medium containing 1% gelatin and 5% sucrose. Wherein, the virus infectious activity decreased by 0.47 lg CCID₅₀. This medium also showed significant protective effect during the virus storage. During 12 months of storage at –20 and –80°C, there was no statistically significant infectious activity reduction compared to the control. In the samples stored at 5°C significant decrease in the quantity of living virions was observed. After 18 months of storage (observation period) the temperature of –80°C and the medium with 1% gelatin and 5% sucrose provided maximum integrity for the virus-containing suspension. This protective medium also showed best results in evaluating the samples appearance and their solubility.

The obtained results indicated the expediency of applying freeze-drying for establishing and replenishment of the virus bank for using in the rabies vaccine production. The storage temperature of –80°C and a growth medium supplemented with 1% gelatin and 5% sucrose can be recommended for the long-term storage of frozen-dried virus.

