УДК 619:616.98:578.824.11:616-036.22

І. М. ПОЛУПАН, кандидат ветеринарних наук
Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

ОЦІНКА РІЗНИХ МЕТОДІВ ЗБЕРІГАННЯ ВАКЦИННИХ ШТАМІВ ВІРУСУ СКАЗУ

В статті представлені результати лабораторних досліджень динаміки інфекційної активності культуральних суспензій вакцинних штамів вірусу сказу при зберіганні їх за температури 4±2 ^{0}С та мінус 18±2 ^{0}С. Проведено ліофільне висушування культуральної суспензії вірусу сказу вакцинного штаму Щолково-51 К та експериментально встановлено найбільш оптимальне захисне середовище.

Ключові слова: вакцинні штами вірусу сказу, титр інфекційної активності вірусу, ліофільне висушування, захисні середовища.

Важливим аспектом при проведенні робіт з вакцинними штамами вірусу сказу є дотримання оптимальних умов їх зберігання, які б забезпечували тривале збереження інфекційної активності вірусу.

Зважаючи на технологічний регламент виготовлення культуральних антирабічних вакцин, виникає необхідність зберігання вірусовмісних суспензій у нативному вигляді. З цією метою використовують холодильні (температура 4±2 ^{0} С) або морозильні камери, в яких температура знахо-диться в межах мінус 18±2 ^{0} С. Однак, при таких температурних режимах неминуче відбувається зниження інфекційної активності вірусу, тому знання динаміки зниження титру є необхідним для забезпечення виробництва високоімуногенних антирабічних вакцин.

Одним із ефективних і загальноприйнятих способів тривалого збереження біологічної (інфекційної) активності мікроорганізмів взагалі, і вакцинних штамів вірусу сказу зокрема, є зберігання вірусовмісного матеріалу в ліофілізованому стані, причому важливого значення набуває підбір стабілізаторів. Даний метод дозволяє зберігати вакцинні штами вірусу сказу до 30-и років і більше [1-3].

Враховуючи вищесказане, **метою** досліджень було вивчення збереженості інфекційної активності вірусу сказу вакцинних штамів Щолково-51 К і РБ-71 в нативному (при температурах мінус 18±2 ^{0}С і 4±2 ^{0}С) та ліофілізованому вигляді.

Матеріали і методи:

В роботі використовували:

- Вірус сказу, вакцинний штам Щолково-51 К, одержаний в лабораторії сказу ІВМ НААН та задепонований у Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) 23.05.2002 р. (реєстраційний номер 206), адаптований до перещеплюваної культури клітин НС (нирки сайги) – 8-12 пасаж, інфекційна активність 6,3-7,2 lg МЛД$_{50}$/см^3;
- Вірус сказу, вакцинний штам 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ (РБ-71), 20-й пасаж у перещеплюваній культурі клітин НС, інфекційна активність 6,4-6,8 lg МЛД$_{50}$/см^3.

Культивування вірусу сказу вакцинних штамів Щолково-51 К та РБ-71 проводили в стаціонарному пристінковому моношарі культури клітин НС. Зараження

культури клітин вірусом проводили «в моношар» з множинністю 0,1 $МЛД_{50}$/клітину. Використовували середовище Ігла (МЕМ) з додаванням 5-7 % сироватки крові ВРХ. Інкубацію проводили в CO_2-інкубаторі при 37 ^{0}С, 5% CO_2 та 95 % вологості протягом 5-6 діб.

Інфекційну активність вірусовмісних суспензій визначали in vivo шляхом титрування на білих мишах за методом H. Koprowski [4].

В нативному вигляді вірусовмісні матеріали зберігали в замороженому (18±2 ^{0}С) та охолодженому (4±2 ^{0}С) стані. Визначення їх інфекційної активності при зберіганні за температури мінус 18±2 ^{0}С здійснювали протягом 2-х років (на 1-6, 12, 18 і 24 місяці), а при зберіганні за t^0 4±2 ^{0}С протягом 90 діб (на 7, 21, 30, 60, 90 добу).

Ліофілізацію вірусу сказу вакцинного штаму Щолково-51 К здійснювали, використовуючи ліофільну сушарку Alpha 1-4 виробництва фірми Martin Christ GmbH (Німеччина) згідно регламенту виробника.

Для зменшення технологічних втрат інфекційної активності при ліофілізації нами підібрані захисні середовища. У якості компонентів захисних середовищ використовували хімічні реактиви фірм «Sigma», «Merck» та вітчизняного виробництва марки х.ч. або ч.д.а.

Вихідні компоненти в необхідних концентраціях розчиняли в дистильованій воді. Величину pH захисних середовищ встановлювали в межах від 6,4 до 6,8, використовуючи в якості корегуючих розчинів 4 % розчин їдкого натру (NaOH) або 0,5 % розчин соляної кислоти (HCl). Простерилізовані захисні середовища після охолодження до температури 4±2 ^{0}С в співвідношенні 1:1 змішувались із вірусовмісною суспензією. При періодичному перемішуванні, технічну рідину фасували по 1 $см^3$ у стерильні флакони, закривали спеціальними корками і відправляли в цех сушки, де заморожували протягом 2-х годин при мінус 18±2 ^{0}С і 10-и годин – при мінус 80±2 ^{0}С. Потім флакони із замороженим вірусовмісним матеріалом поміщали в камеру вакуумно-сушильної установки для проведення зневоднення.

Після ліофільного висушування вірусу проводили оцінку ступеню протекції захисних середовищ за зовнішнім виглядом таблетки, розчинністю і біологічною (інфекційною) активністю вірусного матеріалу. Інфекційну активність ліофілізованих зразків вірусу сказу вакцинного штаму Щолково-51 К визначали відразу після висушування, через 6 і 12 місяців при зберіганні за температури мінус 18±2 ^{0} С та після прогрівання протягом 7-и діб при 37 ^{0} С (тест «швидкого старіння»).

Досліди проводили з числом повторюваності (≥3), що забезпечувало отримання достовірних результатів. Обрахунок середньої арифметичної величини (M) і середньої квадратичної похибки (m) проводили використовуючи методи статистичної обробки та програму MS Excel [5].

Результати досліджень

Для знання часового проміжку, при якому відбувають втрати інфекційної активності на рівні 5-10 %, необхідно встановити динаміку зниження титру при зберіганні за температур 4±2 ^{0}С та мінус 18±2 ^{0}С.

З метою порівняльного аналізу потенційних можливостей різних методів зберігання (заморожений чи охолоджений стан) вірусу сказу вакцинних штамів Щолково-51 К та РБ-71 проведені дослідження з визначення їх інфекційної активності при зберіганні за температури мінус 18±2 ^{0}С протягом 2-х років, а також при зберіганні в умовах холодильної камери за t^0 4±2 ^{0}С протягом 90 діб.

Зберігання вірусовмісного матеріалу за температури мінус 18±2 ^{0}С.

На початку досліджень титр інфекційної активності культурального матеріалу вірусу сказу вакцинних штамів Щолково-51 К і РБ-71 становив 6,85±0,34 та 6,44±0,19 lg МЛД$_{50}$/см^3 відповідно (рисунок 1).

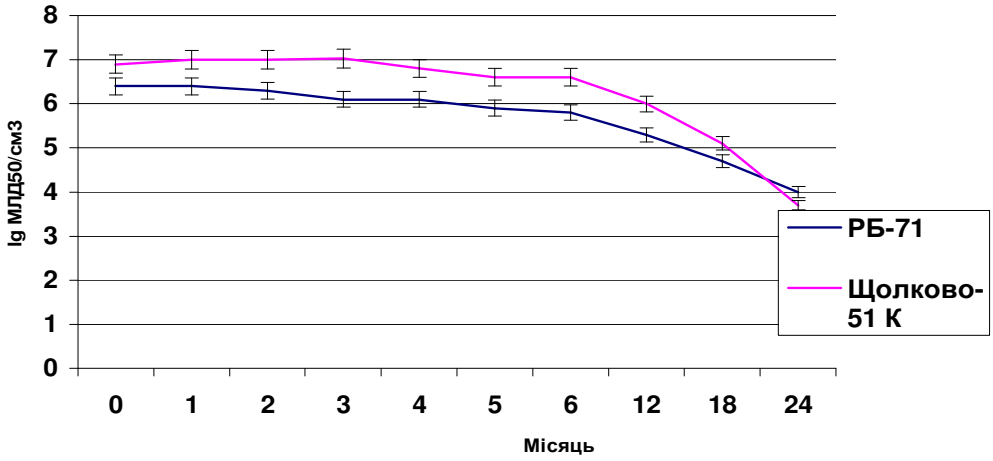

Рис. 1. **Динаміка інфекційної активності вакцинних штамів вірусу сказу при зберіганні за температури мінус 18±2 ^{0}С.**

Протягом перших шести місяців зберігання при даному режимі титр інфекційної активності суспензій вірусу сказу поступово знижувався (на 0,2-0,55 lg МЛД$_{50}$/см^3) і становив для штаму РБ-71 – 5,8±0,2 lg МЛД$_{50}$/см^3, для штаму Щолково-51 К – 6,6±0,2 lg МЛД$_{50}$/см^3.

При подальшому зберіганні за температури мінус 18±2 ^{0}С відмічено продовження зниження їх інфекційної активності. Так, на 12-му місяці титр інфекційної активності вірусу сказу вакцинного штаму РБ-71 становив 5,3±0,2 lg МЛД$_{50}$/см^3, а штаму Щолково-51 К – 6,0±0,2 lg МЛД$_{50}$/см^3.

При дослідженні інфекційної активності вакцинних штамів вірусу сказу у культуральних суспензіях після 24 місяців зберігання за температури мінус 18±2 ^{0}С відмічено її подальше зниження. Так, титр інфекційної активності вірусу сказу вакцинного штаму РБ-71 становив 4,0±0,2 lg МЛД$_{50}$/см^3, а штаму Щолково-51 К – 3,7±0,2 lg МЛД$_{50}$/см^3. Тобто, титр інфекційної активності дослідних штамів вірусу сказу знизився в середньому на 2,85±0,2 lg МЛД$_{50}$/см^3.

Зберігання вірусовмісного матеріалу за температури 4±2 ^{0}С.

Динаміка інфекційної активності культуральних вірусовмісних суспензій вірусу сказу вакцинних штамів РБ-71 і Щолково-51 К при зберіганні за температури 4±2 ^{0}С ілюстрована на рисунку 2.

Так, при даному режимі зберігання протягом перших 7-и діб відмічено зниження титру інфекційної активності, який становив для штаму Щолково-51 К 6,5± 0,2 lg МЛД$_{50}$/см^3, а для штаму РБ-71 – 5,7±0,2 lg МЛД$_{50}$/см^3, при початкових титрах 6,9±0,2 lg МЛД$_{50}$/см^3 та 6,5±0,2 lg МЛД$_{50}$/см^3 відповідно. Тобто, втрати інфекційної активності становили 5,8 % для штаму Щолково-51 К та 12,3 % – для штаму РБ-71.

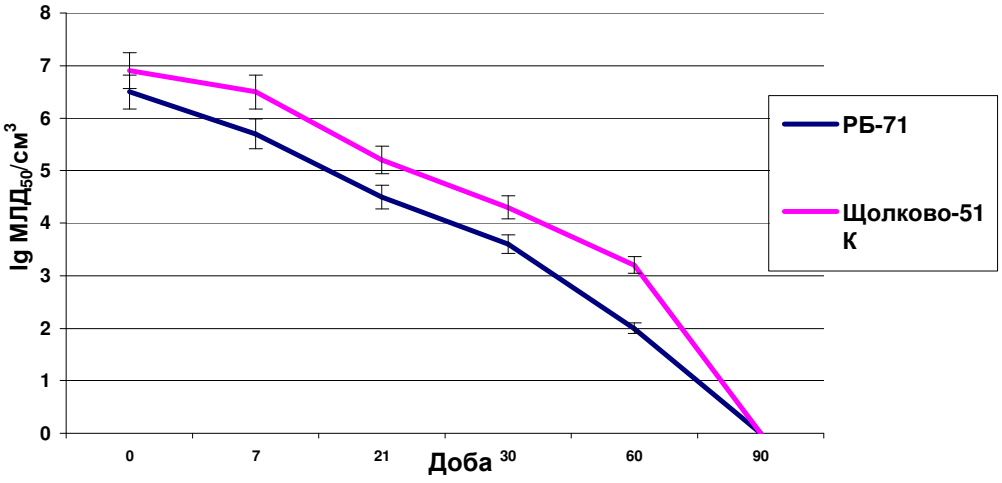

Рис. 2. **Динаміка інфекційної активності вакцинних штамів вірусу сказу при зберіганні за температури 4±2 ^{0}С.**

Через 30 діб зберігання за t^0 4±2 ^{0}С встановлено титр вірусу сказу вакцинного штаму РБ-71 на рівні 3,6±0,2 lg МЛД$_{50}$/см^3, а штаму Щолково-51 К – 4,3±0,2 lg МЛД$_{50}$/см^3. На 90 добу зберігання за t^0 4±2 ^{0}С інфекційної активності вірусу сказу штамів РБ-71 і Щолково-51 К не виявлено.

Ліофілізація вірусу сказу вакцинного штаму Щолково-51 К.

Важливим моментом в процесі ліофілізації є підбір умов, які зменшать технологічні втрати, тобто забезпечать збереження інфекційної активності вірусу. При цьому, для зменшення втрат інфекційної активності вірусу при ліофілізації важливого значення набуває вибір захисних середовищ (стабілізаторів), які б володіли максимальною протективною здатністю.

Для висушування використовували вірус сказу вакцинний штам Щолково-51 К, із вихідною інфекційною активністю – 6,42±0,06 lg МЛД$_{50}$/см^3. В умовах лабораторії приготовлено захисні середовища, які були використані у якості комплексних стабілізаторів при ліофілазації вірусу сказу:

1. желатоза – 10 %, цукроза – 10 %;
2. желатоза – 8 %, мальтоза – 8 %;
3. желатоза – 8 %, мальтоза – 5 %, сорбіт – 2 %;
4. желатоза – 8 %, цукроза – 8 %, сорбіт – 2 %;
5. желатоза – 8 %, цукроза – 10 %, хлорид натрію – 4 %;
6. желатоза – 8 %, мальтоза – 8 %, сорбіт – 1 %, хлорид натрію – 4 %.

Для визначення оптимального захисного середовища нами було досліджено усі ліофілізовані зразки за кількома показниками.

Результати досліджень показали, що незалежно від складу використаних в досліді захисних середовищ в усіх ліофілізованих зразках таблетка була стандартною (суха речовина із однорідною мілкозернистою структурою світло-жовтого або кремового кольору) і повністю розчинялась при додаванні фізіологічного розчину менше ніж за одну хвилину.

Однак, первинна оцінка інфекційної активності дослідних зразків відразу після ліофілізації показала суттєву відмінність в титрах (таблиця 1). Так, при використанні середовищ № 2, 4, 6 титр вірусу знизився на 1,8-2,4 lg $МЛД_{50}/см^3$. Захисні середовища № 1, 3 і 5 забезпечили умови, при яких титр вірусу знизився з 6,42±0,06 до 5,02-5,22 lg $МЛД_{50}/см^3$. Тобто, після висушування з використанням даних середовищ технологічні втрати становили в межах 1,2-1,4 lg $МЛД_{50}/см^3$.

Таблиця 1

Вплив різних стабілізаторів на збереження інфекційної активності вірусу сказу штаму Щолково-51 К при ліофілізації (M±m, n=3)

Захисне середо-вище	Титр вірусу, lg $МЛД_{50}/см^3$.				
	До висушування	Після висушування	Через 6 місяців при мінус 18±2 ^0C	Через 12 місяців при мінус 18±2 ^0C	Тест «швидкого старіння»
1	6,42±0,06	5,19±0,2	5,11±0,1	5,03±0,2	3,62±0,2
2		4,42±0,2	н.д.	н.д.	н.д.
3		5,02±0,2	4,73±0,1	4,78±0,2	3,42±0,2
4		4,62±0,2	н.д.	н.д.	н.д.
5		5,22±0,2	5,26±0,1	5,17±0,1	4,19±0,2
6		4,02±0,2	н.д.	н.д.	н.д.

Примітка: н.д. – не досліджували.

Через 6 місяців зберігання при температурі мінус 18±2 ^0C відібрано зразки, які володіли найвищою інфекційною активністю після висушування (№ 1, 3 та 5) та проведено їх титрування. Встановлено інфекційну активність зразка № 1 на рівні 5,11±0,1 lg $МЛД_{50}/см^3$, зразка № 3 – 4,73±0,1 lg $МЛД_{50}/см^3$, а зразка № 5 – 5,26±0,1 lg $МЛД_{50}/см^3$.

Через 12 місяців зберігання при температурі мінус 18±2 ^0C визначено інфекційну активність зразків № 1, 3 і 5. Титр зразка № 1 був 5,03±0,2 lg $МЛД_{50}/см^3$, зразка № 3 – 4,78±0,2 lg $МЛД_{50}/см^3$, а зразка № 5 – 5,17±0,1 lg $МЛД_{50}/см^3$. Статистично достовірної відмінності у титрах інфекційної активності дослідних ліофілізованих зразків встановлених через 6 та 12 місяців зберігання за t^0 мінус 18±2 ^0C не виявлено.

Отримані результати свідчать про стабільність інфекційної активності ліофілізованого матеріалу вірусу сказу вакцинного штаму Щолково-51 К при зберіганні за температури мінус 18±2 ^0C протягом 12-и місяців (час спостереження).

Для прискореного аналізу стабільності інфекційної активності ліофілізованих матеріалів штаму Щолково-51 К (№ 1, 3 та 5) нами застосовано тест «швидкого старіння», який полягає в прогріванні дослідних зразків при 37 ^0C протягом 7-и діб.

В умовах тесту «швидкого старіння» титр вірусу сказу зразка № 1 знизився на 1,57 lg $МЛД_{50}/см^3$ і становив 3,62±0,2 lg $МЛД_{50}/см^3$. Інфекційна активність зразка № 3 була на рівні 3,42±0,2 lg $МЛД_{50}/см^3$. Найкращими протективними властивостями володіло середовище № 5, при якому титр вірусу при умові тесту «швидкого старіння» знизився на 1,03 lg $МЛД_{50}/см^3$ і становив 4,19±0,2 lg $МЛД_{50}/см^3$.

Висновки:

1. Вивчені умови зберігання культуральних суспензій вакцинних штамів вірусу сказу при різних температурах (4±2 ^{0}С та мінус 18±2 ^{0}С) та встановлено динаміку зниження їх інфекційної активності. Встановлено, що спосіб зберігання культуральних суспензій вакцинних штамів вірусу сказу в морозильній камері за температури мінус 18±2 ^{0}С придатний протягом 3-6-ти місяців, а умови холодильної камери (температура 4±2 ^{0}С) придатні для нетривалого (до 7-и діб) зберігання вакцинних штамів вірусу сказу.

2. Підібране оптимальне захисне сахарозо-желатозове середовище на гіпертонічному (4 %) розчині натрію хлориду для ліофільного висушування культуральної вірусовмісної суспензії, при застосуванні якого досягнуто мінімальних втрат титру інфекційної активності на рівні 1,2±0,1 lg $МЛД_{50}$/см^3.

1. *Иванов В. С.* Бешенство животных: экспериментально-теоретическое обоснование разработки, производства, применения культуральных инактивированных вакцин и новые подходы к проблеме экстренной защиты ЦНС от возбудителя заболевания: автореферат дис. на соиск. уч. ст. докт. вет. наук: спец. 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология» / Виктор Иванов – Щелково. – 2001. – 60 с.

2. Laboratory techniques in rabies 4-ed. / Martin M. Kaplan, Hilary Koprowski. – Geneva: WHO. – 1996. – 476 p.

3. Пат. 890591 Российская Федерация, Штамм Fixedrabies virus Щелково-51 для производства антирабических вакцин / Кузнецов П.П., Иванов В.С., Кузнецова С.В., Игнатьева В.С.; заявитель и патентообладатель – Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности РАСН. – приоритет 12.07.1980. – опубл. 11.01.1993.

4. Методы лабораторных исседований по бешенству / Под редакцией Martin M. Kaplan, Hilary Roprowski. – Женева: ВОЗ. – 1975. – 360 с.

5. *Лакин Г. Ф.* Биометрия / Г. Ф. Лакин– М.: Высшая школа. – 1990. – 352 с.

ОЦЕНКА РАЗНЫХ МЕТОДОВ СОХРАННОСТИ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА / И.Н. Полупан

В статье представлены результаты лабораторных исследований динамики инфекционной активности культуральных суспензий вакцинных штаммов вируса бешенства при сохранении их при температуре 4±2 ^{0}С и минус 18±2 ^{0}С. Проведено лиофильное высушивание культуральной суспензии вируса бешенства вакцинного штамма Щелково-51 К и экспериментально определена наиболее оптимальная защитная среда.

Ключевые слова: вакцинные штаммы вируса бешенства, титр инфекционной активности вируса, лиофильное высушивание, защитные среды.

EVALUATION OF DIFFERENT METHODS OF PRESERVATION OF RABIES VIRUS VACCINE STRAINS / I. Polupan

The paper presents the results of laboratory research of the dynamics of infectious activity of culture suspensions of rabies virus vaccine strains while maintaining them at a temperature of 4±2 ^{0}C and minus18±2 ^{0}C. A freeze-drying of a cultural suspension of rabies virus vaccine strain Schelkovo 51-K was conducted and experimentally determined the optimal protective environment.

Keywords: vaccine strains of rabies virus, titer of virus infectious activity, freeze-drying, protective environment.

Рецензент – кандидат ветеринарних наук **В. А. Уховський**