



УКРАЇНА

(19) UA (11) 67184 (13) U  
(51) МПК (2012.01)  
C12N 7/00ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ ШТАМІВ АРБОВІРУСІВ

1

2

(21) u201107449

(22) 14.06.2011

(24) 10.02.2012

(46) 10.02.2012, Бюл. № 3, 2012 р.

(72) ЛОЗИНСЬКИЙ ІГОР МИКОЛАЙОВИЧ, ШО-  
ЛОМЕЙ МИХАЙЛО ВОЛОДИМИРОВИЧ, КОЗЛОВ-  
СЬКИЙ МИХАЙЛО МИХАЙЛОВИЧ, БІЛЕЦЬКА ГА-  
ЛИНА ВАЦЛАВІВНА, СЕМЕНИШИН ОКСАНА  
БОГДАНІВНА, ДРУЛЬ ОКСАНА СТЕФАНІВНА,  
ФЕДУРЮК ВОЛОДИМИР ІЛЛІЧ, ТУРКО МАРІЯ  
ВАСИЛІВНА(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ЛЬВІВСЬКИЙ НАУ-  
КОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА  
ГІГІЄНИ МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я  
УКРАЇНИ"

(57) Спосіб ліофілізації штамів арбовірусів, що включає приготування вірусомісної суспензії, її заморожування та сублімацію з наступним досушуванням вихідного препарату, який **відрізняється** тим, що для приготування вірусомісної суспензії використовують розчин Хенкса і мозкові тканини 2-3-х денних новонароджених білих мишей, інфікованих вірусом Західного Нілу, та розчини альбуміну і сахарози як стабілізатор і кріопротектор, заморожування суспензії проводили 15 хв. при температурі -80 °C з наступним висушуванням 5 годин при кімнатній температурі, що дозволяє зберігати при температурі +4 °C вірулентність арбовірусів без зниження біологічної активності більше 2-х років.

Корисна модель належить до медицини, а саме вірусології, і може бути використана у виробництві препаратів для лікування, профілактики і лабораторної діагностики захворювань, що викликаються вірусом Західного Нілу (ЗН) та іншими арбовірусами.

Приготування імунобіологічних препаратів з використанням живих культур збудників арбовірусних інфекцій та проведення наукових досліджень для вивчення їх біологічних властивостей зумовлюють необхідність довготривалого їх зберігання без втрати інфекційної активності.

Зберігання штамів арбовірусів при низьких температурах: в рідкому азоті при температурі -196 °C та у низькотемпературних холодильниках при температурі -80 °C, є дороговартісним способом їх тривалої консервації і супроводжується постійною загрозою втрати вірулентності через зміну температури зберігання. Відомі режими ліофілізації вірусів для виробництва живих і вбитих вірусних вакцин та діагностичних препаратів обмежують термін зберігання штамів 1-1,5 роками [1, 2]. Спосіб ліофілізації арбовірусів для довготривалого зберігання не виявлено.

З огляду на вищесказане, задача корисної моделі є пошук дешевих і надійних способів довготривалого зберігання живих культур штамів арбовірусів без суттєвого зниження їх інфекційної активності завдяки розробці оптимальних умов ліофілізації інфекційного матеріалу, а саме: підбо-

ру температурного режиму заморожування та висушування його, складу захисного середовища та структури вірусомісної суспензії з врахуванням біологічних особливостей штаму арбовірусу [1, 2, 3].

Задача вирішується шляхом приготування вірусомісної суспензії, її заморожування та сублімації з наступним досушуванням вихідного препарату, згідно з корисною моделлю, включає для приготування вірусомісної суспензії використання розчину Хенкса і мозкової тканини 2-3-х денних новонароджених білих мишей (н.б.м.), інфікованих вірусом Західного Нілу, розчинів альбуміну і сахарози як стабілізатор і кріопротектор, заморожування суспензії впродовж 15 хв. при температурі -80 °C з наступним висушуванням впродовж 5 годин при кімнатній температурі, що дозволяє зберігати при температурі +4 °C вірулентність арбовірусів без зниження біологічної активності більше 2-х років.

Пропонований спосіб здійснювали наступним чином. Для приготування 10 % суспензії вірусу ЗН використовували мізки 2-3-х денних н.б.м., інфікованих штамми №№ 3266 та 5374, що депоновані в Колекції штамів арбовірусів ДУ «Львівський науково-дослідний інститут епідеміології та гігієни МОЗ України» (лабораторія трансмісивних вірусних інфекцій), котрі розтирали у фарфорових ступках з додаванням розчину Хенкса, а потім - 2 % розчину альбуміну і сахарози для рівномірного

(19) UA (11) 67184 (13) U

зневоднення вірусомісного матеріалу в процесі подальшого висушування суспензії [4, 5, 6].

Суспензію центрифугували при температурі +4 °С 10 хвилин при 2000 обертів на хвилину. Надосадкову рідину розділяли на дві частини. Першу розливали по 0,3 мл у стерильні ампули для ліофілізації, другу залишали у побутовому холодильнику для контролю впливу процесу ліофілізації на вірулентність вірусів. Ліофілізацію проводили на ліофільному сушінні фірми JOUAN, марки LVOV AB - 300 ID 88872241. Ампули заморожували впродовж 15 хв. при температурі -80 °С, висушували 5 годин при кімнатній температурі, запаювали і зберігали у побутовому холодильнику при температурі +4 °С.

Для визначення впливу процесу висушування на вірулентність вірусів 2-3-х денних н.б.м. інфікували в мозок розчиною в дистильованій воді попередньо приготовленою вірусомісною ліофілізованою суспензією. Неліофілізовану суспензію, що зберігалась в побутовому холодильнику, використовували як контроль. На кожну експериментальну умову брали по 6-9 мишей-сисунків. Спостереження за інфікованими тваринами проводили двічі на день впродовж 14 днів.

Для визначення впливу терміну та температурного режиму зберігання ліофілізованого вірусомісного матеріалу на його стабільність і інфекційну активність висушені запропонованим способом штами арбовірусів після 2-х років зберігання їх при температурі +4 °С розчиняли дистильованою водою і далі готували на фізіологічному розчині їх зростаючі десятикратні розведення від  $10^{-1}$  до  $10^{-10}$ . Для порівняння як контроль використовували свіжоприготовлену 10 % суспензію мізків 2-3-х денних н.б.м., інфікованих досліджуваними штамами вірусу ЗН №№ 3266 та 5374.

Кожним розведенням вірусу внутрішньомозково інфікували групу з 6-8 2-3-х денних н.б.м., за якими спостерігали впродовж 14 днів. LD<sub>50</sub> визначали методом Ріда і Менча [7].

Розроблений спосіб ілюструється наступними результатами проведених досліджень.

При визначенні впливу вищеописаної технології ліофілізації на вірулентність вірусу ЗН встановлено, що статистично достовірних відмінностей між дослідними та контрольними групами інфікованих тварин не виявлено.

Так, при інфікуванні н.б.м. штамом № 3266 основні ознаки захворювання з чіткою клінікою експериментального енцефаліту спостерігались у всіх дослідних та контрольних тварин, причому у дослідній групі вони реєструвались на 4-5 дні, а у контрольній - на 4-8 дні, і завершилось інфікування 100 % летальністю.

У випадку інфікування н.б.м. штамом № 5374 спостерігалась аналогічна картина з тією лише різницею, що чітка клініка захворювання спостері-

галась в дослідній групі на 3-4 дні, а в контролі - на 4-7 дні.

Як показали дані дослідження, апробований спосіб ліофілізації не лише не знижував вірулентність вказаних штамів арбовірусу, а навіть на 1-3 дні прискорював розвиток арбовірусної інфекції у піддослідних мишей.

Досліджуючи вплив терміну та температурного режиму зберігання на стабільність і інфекційну активність ліофілізованого вірусомісного матеріалу встановлено, що після 2-х років зберігання при температурі +4 °С ліофілізованого штаму № 3266 інфекційний титр його складав 5,5 lg LD<sub>50</sub>, а свіжоприготовленого аналогічного взірця 5,7 lg LD<sub>50</sub>. Щодо штаму № 5374 дані показники були такими: інфекційний титр ліофілізованого взірця складав 7,4 lg LD<sub>50</sub>, в той час як свіжоприготовленого - 7,1 lg LD<sub>50</sub>. Наведені результати вказують на чітко виражену стабільність ліофілізованих штамів вірусу ЗН впродовж 2 років їх зберігання.

Таким чином, запропонований спосіб ліофілізації штамів арбовірусів не знижує їх інфекційної активності і забезпечує виражену біологічну стабільність впродовж тривалого терміну зберігання в звичайних умовах при температурі +4 °С. Використання даного способу матиме важливе практичне значення для консервування живих культур арбовірусів завдяки низькій вартості і високій надійності довготривалого зберігання, оскільки не потребує для цих цілей використання в сьогоденні умовах дорогих матеріалів (рідкого азоту) та низькотемпературних холодильників.

Джерела інформації:

1. Львов Д.К., Клименко С.М., Гайдамович С.Я. // Арбовирусы и арбовирусные инфекции, - М.: Медицина, -1989. - 335 с.
2. Подольский М.В.. Всушивание препаратов крови и кровезаменителей. - М.: Медицина, - 1973. - 192 с.
3. Криопротекторы // Пушкар Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. -К.: Наук, думка, 1978. - 204 с.
4. Арбовирусы (методы лабораторных и полевых исследований). Под ред. С.Я. Гайдамович. - М.: Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР, - 1986. - С. 90-93.
5. Иммунологическая диагностика вирусных инфекций. // Под ред. Т.В. Перадзе, Г. Халонена. - М.: Медицина, - 1985. - 300 с.
6. Пат. 16963 України, МПК C12N7/00. Штам вірусу Західного Нілу (Virus Nili Occidentalis) № 3266 для виготовлення специфічних імунобіологічних препаратів. / І.М. Лозинський, Г.В. Білецька, М.М. Козловський та ін. // Заявка № 2005 11875 від 12.12.2005. Оуб. 15.09.2006. Бюл. № 9.
7. Шубладзе А.К., Гайдамович С.Я. // Краткий курс практической вирусологии // - М.: Медгиз.- 1964. - С. 62-77.