



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94945 (13) C2

(51) МПК

A61K 35/12 (2006.01)

A61P 1/18 (2006.01)

C12N 9/94 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ Й ВИЗНАЧЕННЯ ВІРУСНОГО НАВАНТАЖЕННЯ В ЗРАЗКУ ПАНКРЕАТИНУ

1

2

(21) а200814138

(22) 21.05.2007

(24) 25.06.2011

(86) PCT/EP2007/054880, 21.05.2007

(31) 06114329.3

(32) 22.05.2006

(33) EP

(46) 25.06.2011, Бюл.№ 12, 2011 р.

(72) БЕХЕР ДІТМАР, DE, ДЬОНЕР ЛЕОПОЛЬД,
DE, БУССЕ ФРАУКЕ, DE, ФРІНК МАРТИН, DE

(73) СОЛВЕЙ ФАРМАС'ЮТИКАЛС ГМБХ, DE

(56) WO 98/38292 A 03.09.1998

WO 91/16060 A 31.10.1991

EP 1593688 A 09.11.2005

DE 19856415 A 15.06.2000

(57) 1. Спосіб виділення вірусного навантаження зі зразка панкреатину, що полягає в тому, що :

а) приготують рідкий експериментальний зразок панкреатину, придатний для центрифугування, зі зразка панкреатину, не змінюючи його вірусного навантаження;

б) піддають щонайменше одну певну частину експериментального зразка панкреатину, отриманого на стадії а) способу, щонайменше одному низькошвидкісному центрифугуванню при відносній відцентровій силі менш ніж 10000 x g;

в) відкидають всі тверді відкладення, які необов'язково утворюють на стадії б) способу під час низькошвидкісного центрифугування й зберігаються в супернатанті експериментального зразка панкреатину;

г) піддають щонайменше одну певну частину супернатанту експериментального зразка панкреатину, отриманого на стадії в) способу, ультрацентрифугуванню в середовищі зі східчастим градієнтом, де тривалість ультрацентрифугування становить щонайменше 1 год. й відносна відцентрова сила для центрифугування становить щонайменше 100000 x g; та

д) кількісно виділяють цільову фракцію, що містить вірусне навантаження із супернатанту експериментального зразка панкреатину.

2. Спосіб за п. 1, у якому на додаток до стадії д) способу здійснюють додаткову стадію е) способу, що полягає в тому, що кількісно визначають вірусне навантаження в зразку панкреатину шляхом ви-

значення титру вірусної інфекції в утримуючій вірусне навантаження цільовій фракції.

3. Спосіб за п. 2, у якому розведену або нерозведену цільову фракцію фільтрують через мікрофільтр перед здійсненням кількісного визначення вірусного навантаження.

4. Спосіб за п. 1, у якому на стадії а) способу приготують експериментальний зразок панкреатину у вигляді суспензії експериментального зразка панкреатину шляхом об'єднання зразка панкреатину із середовищем для культивування клітин, що придатне для лінії клітин, використовуваної для культивування підлягаючому дослідженню типу вірусу, і з одним або декількома антибіотиками.

5. Спосіб за п. 4, у якому готування експериментального зразка панкреатину здійснюють при охолодженні до температури 0-15 °C.

6. Спосіб за п. 1, у якому низькошвидкісне центрифугування на стадії б) способу в кожному випадку здійснюють при відносній відцентровій силі 1500-5000 x g.

7. Спосіб за п. 1, у якому низькошвидкісне центрифугування на стадії б) способу здійснюють протягом щонайменше 5 хв.

8. Спосіб за п. 1, у якому ультрацентрифугування на стадії г) способу здійснюють протягом 2-8 год. і відносна відцентрова сила становить 200000-350000 x g.

9. Спосіб за п. 1, у якому низькошвидкісне центрифугування на стадії б) способу й ультрацентрифугування на стадії г) способу в кожному випадку здійснюють при охолодженні до температури 0-15 °C.

10. Спосіб за п. 1, у якому середовище зі східчастим градієнтом, використовуване на стадії г) способу, являє собою двофазний східчастий градієнт сахарози.

11. Спосіб за п. 10, у якому середовище зі східчастим градієнтом являє собою градієнт, отриманий з використанням 50 % (мас./об.) забуференого розчину сахарози й 20 % (мас./об.) забуференого розчину сахарози.

12. Спосіб за п. 1, у якому зразок панкреатину являє собою зразок панкреатину свині.

(13) C2

(11) 94945

(19) UA

13. Спосіб за п. 1, у якому вірусне навантаження в експериментальному зразку панкреатину являє собою ротавірус А корів, вірус енцефаломіокардита, цирковірус свиней, парвовірус свиней, ротавірус А свиней, тешовірус свиней і/або вірус захворювання свиней з везикулярним синдромом.

14. Виділена цільова фракція, яку одержують за допомогою способу за п. 1.

15. Виділена цільова фракція за п. 14, де на стадії а) способу експериментальний зразок панкреатину приготують у вигляді суспензії експериментального зразка панкреатину шляхом об'єднання зразка панкреатину із середовищем для культивування клітин, що придатне для лінії клітин, використаної для культивування підлягаючому дослідженню типу вірусу, і з одним або декількома антибіотиками.

Даний винахід відноситься до способу практично кількісного виділення вірусного навантаження зі зразка панкреатину й способу кількісного визначення вірусного навантаження в зразку панкреатину.

Панкреатин являє собою вже давно відому суміш різних компонентів, що володіють фізіологічною активністю, що одержують із панкреатичних залоз ссавців. Основними компонентами панкреатину є травні ферменти, насамперед панкреатична ліпаза, а також амілази й протеази. Завдяки його коштовним терапевтичним властивостям і високому ступеню безпеки при застосуванні панкреатин уже давно використовують із більшим успіхом як фармацевтичний препарат у ферментній замісній терапії. Щодо цього найбільше значення має панкреатична ліпаза, однак амілази й протеази також вносять значний вклад у терапевтичну сприятливу дію панкреатину. Для терапевтичних цілей панкреатин, як правило, одержують із великої рогатої худоби («бичачий панкреатин») або свиней («свинячий панкреатин»), при цьому свинячий панкреатин з кількісної точки зору має найбільше значення. Методи одержання панкреатину для терапевтичних цілей відомі *per se*, наприклад, вони описані в публікації EP 0115023 A.

Внаслідок того, що панкреатин одержують із організму тварин, вихідні продукти можуть містити небажані біологічні компоненти, такі як бактеріальні або вірусні домішки. Однак протягом більш ніж 100 років комерційного застосування фармацевтичних продуктів, що містять панкреатин, не було зафіксовано жодного випадку шкідливого впливу утримуючого вірусні домішки панкреатину на пацієнтів. Проте, компанії, що роблять фармацевтичні продукти, які одержують із біологічних тканин і/або рідин організму, випробовують весь зростаючий тиск із боку регулюючих адміністративних органів відносно підвищення рівня безпеки продуктів, що випускаються ними, шляхом зниження вмісту всіх домішок до максимального низького рівня незалежно від того, чи вважається розглянута домішка патогенною для людини чи ні. Таким чином, для застосування панкреатину у фармакологічних продуктах бажано мати у своєму розпорядженні надійні аналітичні методи виявлення й кількісної оцінки таких біологічних домішок.

До теперішнього часу не був розроблений надійний метод кількісного виявлення або виділення вірусних домішок у зразку панкреатину. Це, очевидно, обумовлене тим, що володіючи ферментати-

вною активністю компонента панкреатину несумісні з лініями клітин, які застосовують для розмноження вірусів за допомогою методів, відомих звичайним фахівцям у даній галузі, що утрудняє або навіть унеможлиблює визначення титру вірусу в зразку панкреатину.

Таким чином, в основу винаходу було покладене завдання розробити спосіб практично кількісного виділення вірусного навантаження зі зразка панкреатину й спосіб кількісного визначення вірусного навантаження в цьому зразку панкреатину. Зокрема, завдання винаходу полягало в тім, щоб розробити спосіб практично кількісного виділення інфекційного вірусного навантаження зі зразка панкреатину й спосіб кількісного визначення інфекційного вірусного навантаження в цьому зразку панкреатину.

При створенні винаходу знезацька було встановлено, що вірусне навантаження, насамперед інфекційне вірусне навантаження, у зразку панкреатину можна практично кількісно визначати в тому випадку, коли вірусне навантаження спочатку виділяють зі зразка панкреатину за допомогою багатостадійного процесу центрифугування й потім виділене вірусне навантаження кількісно оцінюють із використанням відомих *per se* вірусологічних методів.

В опублікованому JP 12856990 уже був описаний метод концентрування або виділення вірусів гепатиту з використанням нестандартної комбінації низькошвидкісного центрифугування й ультратентрифугування.

Перший варіант здійснення винаходу відноситься до способу виділення вірусного навантаження зі зразка панкреатину, що полягає в тім, що:

а) наготують рідкий експериментальний зразок панкреатину, придатний для центрифугування, зі зразка панкреатину, не змінюючи його вірусного навантаження;

б) піддають щонайменше одну певну частину експериментального зразка панкреатину, отриманого на стадії а) способу, щонайменше одному низькошвидкісному центрифугуванню в умовах, у яких віруси, що характеризуються константами седиментації ≥ 120 S, не утворюють дебрис;

в) відкидають всі тверді відкладення, які не обов'язково утворюються на стадії б) способу під час низькошвидкісного центрифугування й зберігаються в супернатанті експериментального зразка панкреатину;

г) піддають щонайменше одну певну частину супернатанта експериментального зразка панкреатину, отриманого на стадії в) способу, ультрацентрифугуванню в середовищі зі східчастим градієнтом, де тривалість ультрацентрифугування й відносну відцентрову силу для центрифугування вибирають таким чином, щоб вірусне навантаження кількісно транспортувалося із супернатанта експериментального зразка панкреатину в цільову фракцію, що перебуває вище прикордонного шару або в прикордонному шарі між розташованим зверху компонентом градієнта з найменшою концентрацією й розташованим знизу компонентом градієнта з наступною більше високою концентрацією; і

д) кількісно виділяють цільову фракцію, що містить вірусне навантаження із супернатанта експериментального зразка панкреатину.

Другий варіант здійснення винаходу відноситься до способу кількісного визначення вірусного навантаження в зразку панкреатину, насамперед інфекційного вірусного навантаження в зразку панкреатину. У цьому другому варіанті здійснення винаходу на додаток до способу, запропонованому в першому варіанті здійснення винаходу, здійснюють після стадії д) способу додаткову стадію е) способу, що полягає в тім, що кількісно визначають вірусне навантаження в зразку панкреатину шляхом визначення титру вірусної інфекції в утримуючій вірусне навантаження цільовій фракції.

Якщо спеціально не зазначене інше, то всі технічні й наукові поняття, уживані нижче, повинні мати в кожному випадку таке ж значення, що звичайно має на увазі фахівець у конкретній галузі техніки. Діапазони температур, зазначені нижче в даному описі, наприклад, у форматі «0-15°C», означають діапазон температур від 0°C до 15°C, включаючи в кожному випадку границі діапазону. Інтервали часу, зазначені нижче в даному описі, наприклад, у форматі «30-120 хв», означають інтервал часу від 30 хв до 120 хв, включаючи в кожному випадку границі діапазону. Інтервали часу, зазначені нижче в даному описі, наприклад, у форматі «2-8 год», означають інтервал часу від 2 год до 8 год, включаючи в кожному випадку границі діапазону. Діапазони відносної відцентрової сили, зазначені нижче в даному описі, наприклад, у форматі «1500-5000×g», означають відносну відцентрову силу, що перебуває в діапазоні від 1500×g до 5000×g, включаючи в кожному випадку границі діапазону. Діапазони об'єму, зазначені нижче в даному описі, наприклад, у форматі «10-15 мл», означають діапазон обсягу від 10 мл до 15 мл, включаючи в кожному випадку границі діапазону. Діапазони мер довжини, зазначені нижче в даному описі, наприклад, у форматі «80-100 мм», означають діапазон мір довжини від 80 мм до 100 мм, включаючи в кожному випадку границі діапазону.

Спосіб, пропонований у винаході, можна застосовувати для всіх типів панкреатину тваринного походження й зокрема його можна застосовувати для звичайних вступників на ринок типів свинячого панкреатину й бичачого панкреатину. Переважно спосіб здійснюють на зразках свинячого панкреатину.

Спосіб, пропонований у винаході, у цілому можна застосовувати для виділення вірусного навантаження зі зразка панкреатину й наступного кількісного визначення вірусного навантаження в зразку панкреатину. Зокрема, спосіб можна застосовувати для виділення й кількісного визначення вірусного навантаження в зразках панкреатину, де вірусне навантаження являє собою ротавірус А корів, вірус енцефаломіокардита (EMCV), цирковірус свиней (PCV), парвовірус свиней (PPV), ротавірус А свиней, тешовірус свиней і/або вірус захворювання свиней з везикулярним синдромом (SVDV). Завдяки дуже близьким властивостям людський Коксаки - вірус В 5/1 можна використати як модель для перевірки придатності способу, пропонованого у винаході, для виділення й/або кількісного визначення SVDV. Завдяки дуже близьким властивостям ротавірусу А корів (наприклад, штам В 223) можна використати як модель для перевірки придатності способу, пропонованого у винаході, для виділення й/або кількісного визначення ротавірусу А свиней.

Застосовуваний на стадії а) способу, пропонованого у винаході, рідкий експериментальний зразок панкреатину, який можна використати для центрифугування, одержують зі зразка панкреатину без зміни або модифікації в ньому вірусного навантаження, насамперед інфекційного вірусного навантаження. Це можна здійснювати, наприклад, шляхом готування суспензії експериментального зразка панкреатину зі зразка панкреатину. Суспензію експериментального зразка панкреатину нагтовлюють шляхом об'єднання зразка панкреатину із середовищем для культури клітин, що придатна для лінії клітин, використовуваної для культивування призначених для вивчення видів вірусу, і з одним або декількома антибіотиком (ами), придатним (і) для цієї мети. Як правило, для одержання розчину антибіотиків, що необов'язково застосовують на стадії а) способу, можна використати будь-які антибіотики. Як правило, застосовують антибіотики широкого спектра дії або суміші таких антибіотиків широкого спектра дії. Придатні антибіотики можна вибирати, наприклад, із групи, що включає антибіотики β-лактамового типу, такі як пеніциліни, цефалоспори́ни (включаючи оксацифеми й карбацефеми), карбапенеми й монобактами; стрептоміцин (включаючи стрептоміцину сульфат); неоміцини (включаючи неоміцин А, неоміцин В і пароміцин); канамици́ни (включаючи канаміцин, гентаміцин, амикацин і тобраміцин); спектіноміцин; тетрацикліни (включаючи тетрациклін, окситетрациклін, доксициклін і міноциклін); макролідні антибіотики (включаючи еритроміцин, кларитроміцин, рокситроміцин, азитроміцин, йозаміцин і спіраміцин); інгібітори гірази (включаючи налідиксінову кислоту, ціноксацин, пипемідінову кислоту, норфлоксацин, пефлоксацин, ципрофлоксацин, офлоксацин і флероксацин); антагоністи фолієвої кислоти (включаючи сульфонамідні антибіотики, діамінобензилпіримідини і їхні комбінації); хлорамфенікол; лінкозаміди; глікопептидні антибіотики (включаючи ванкоміцин і теїкопланін); фосфоміци́ни; поліпептидні антибіотики (включаючи поліміксин В, колістин, бацитрацин і тіротицин) і

мупіроцин. Кращими антибіотиками є стрептоміцину сульфат і суміші стрептоміцину сульфату й пеніциліну, наприклад, «коктейль» з антибіотиків. Один або кілька антибіотиків можна застосовувати, наприклад, у вигляді розчину в розчиннику, що придатний для одного або декількох антибіотиків у кожному випадку, тобто у вигляді розчину антибіотиків.

Суспензію експериментального зразка панкреатину, як правило, нагтовлюють при охолодженні до температури 0-15°C, наприклад, до температури 4-10°C. Компоненти для одержання суспензії експериментального зразка панкреатину, як правило, перемішують при охолодженні на льоді протягом щонайменше 30 хв, наприклад, 30-120 хв, переважно 45-90 хв, зокрема, протягом 50 або 60 хв. Ціль охолодження суспензії експериментального зразка панкреатину в кожному випадку полягає в тім, щоб уникнути або щонайменше істотно знизити будь-яку небажану дезактивацію вірусного навантаження, обумовлену компонентами, що володіють ферментативною активністю, що є присутнім у зразку панкреатину. Один з варіантів здійснення винаходу відноситься також до суспензії експериментального зразка панкреатину, яку можна нагтовлювати відповідно до стадії а) способу.

Які середовища для культур клітин застосовують у кожному випадку для готування суспензії експериментального зразка панкреатину на стадії а) способу, визначається тим, які види вірусів потрібно виділяти й/або кількісно визначати за допомогою способу, пропонуваного у винаході. Для культивування й виявлення конкретних видів вірусів використовують дозволені для застосування культури клітин, у яких ініціюють підлягаючі вивченню види вірусів, якщо це можливо, цитопатичну дію (CPE). CPE приводить до модифікації зараженого вірусом клітин, яку можна виявляти за допомогою світлової мікроскопії. Якщо види вірусів розмножуються в культурі клітин без CPE, то, як правило, таке розмноження можна, проте, виявити за допомогою відомих *per se* непрямих методів виявлення.

Якщо, наприклад, потрібно виділити й/або кількісно визначити ротавірус А корів, то можна, наприклад, застосовувати для його культивування клітини нирки ембріона мавпи (клітини лінії MA-104). У цьому випадку як середовище для культури клітин можна застосовувати відоме *per se* модифіковане за способом Дульбекко середовище Голка (середовище Дульбекко). Якщо потрібно виділити й/або кількісно визначити EMCV, то для його культивування можна застосовувати клітини нирки свині (клітини лінії PK-15) або клітини нирки ембріона свині (клітини лінії SPEV). У випадку клітин лінії PK-15 можна застосовувати як придатне середовище для культури клітин, наприклад, відоме *per se* мінімальне незамінне середовище (MEM). У випадку клітин лінії SPEV як середовище для культури клітин можна застосовувати середовище Дульбекко. Якщо, наприклад, потрібно виділити й/або кількісно визначити PCV, то для його культивування можна використати, наприклад, клітини лінії PK-15. Якщо, наприклад, потрібно

виділити й/або кількісно визначити PPV, то для його культивування можна використати, наприклад, клітини нирки свині (клітини лінії SK-6). У цьому випадку як середовище для культури клітин можна застосовувати, наприклад, середовище Дульбекко. Якщо, наприклад, потрібно виділити й/або кількісно визначити ротавірус А свиней, то для його культивування можна використати, наприклад, клітини лінії MA-104. Якщо, наприклад, потрібно виділити й/або кількісно визначити тешовірус свиней, то для його культивування можна використати, наприклад, клітини лінії PK-15. Якщо, наприклад, потрібно виділити й/або кількісно визначити SVDV, то для його культивування можна використати, наприклад, клітини лінії SPEV. Фахівець у даній галузі має відомості про те, які лінії клітин придатні для культивування конкретних видів вірусів і які середовища для культивування клітин можна використати для цієї мети. Види вірусів, які можна застосовувати згідно із даним винаходом, і придатні для цієї мети лінії клітин можна одержувати з відповідних джерел, таких, наприклад, як «Американська колекція типових культур (American Type Culture Collection)», Манассас, США (ATCC), «Німецька колекція мікроорганізмів і клітинних культур Гмб (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Gmb), Брауншвейг, Німеччина (DSMZ), «Інститут Фрідріха - Леффлера (Friedrich - Löffler - Institut)», Федеральний дослідницький інститут ветеринарії (Federal Research Institute for Animal Health), Інзель Ріме, Німеччина (FLI) або «Відділення ветеринарної служби (Veterinary Service Division)» «Департамент сільського господарства й сільського розвитку (Department of Agriculture and Rural Development)», Белфаст, Великобританія (DARD).

На стадії б) способу експериментальний зразок панкреатину, отриманий на стадії а) способу, можна або використати повністю, або можна використати певну частину експериментального зразка панкреатину, зокрема, певний обсяг цього експериментального зразка панкреатину. Переважно експериментальний зразок панкреатину, отриманий на стадії а) способу, використовують повністю.

На стадії б) способу при здійсненні низькошвидкісного центрифугування можна створювати умови, у яких віруси, що характеризуються константами седиментації ≥ 120 S, насамперед від ≥ 120 S до 5000 S, ще не утворюють дебрис. Як правило, віруси, що характеризуються константами седиментації ≥ 120 S, насамперед віруси, що характеризуються константами седиментації від ≥ 120 S до 5000 S, ще не утворюють дебрис, коли низькошвидкісне центрифугування здійснюють при відносно невеликих відцентрових силах, що становлять у кожному випадку менш $10000 \times g$, переважно складових у кожному випадку $1500-5000 \times g$, найбільше переважно складових у кожному випадку $2000-3500 \times g$, наприклад, складових у кожному випадку $2700 \times g$. Тривалість стадії низькошвидкісного центрифугування звичайно становить щонайменше 5 хв, як правило, 5-60 хв, насамперед 10-45 хв, переважно 10-30 хв, наприклад, 15 хв. У кращому варіанті здійснення стадії б) способу стадії низькошвидкісного центрифугування здійснюють при

охолодженні до температури 0-15°C, наприклад, до температури 4-10°C, переважно в охолоджувальній центрифугі.

Ціль здійснення процедур низькошвидкісного центрифугування на стадії б) способу полягає в основному у видаленні із суспензії панкреатину таких компонентів панкреатину, як нерозчинні частки й т.д., які руйнуються в процесі виділення й/або кількісного визначення вірусного навантаження в зразку панкреатину, для одержання супернатанта експериментального зразка панкреатину, придатного для подальшого процесінгу. Таким чином, тверді відкладення, які необов'язково одержують на стадіях низькошвидкісного центрифугування, як правило, відкидають при здійсненні стадії в), у той час як супернатант використовують на наступній стадії г) способу. Стадії низькошвидкісного центрифугування з наступним відкиданням необов'язково отриманих при цьому твердих відкладень, як правило, повторюють доти, поки тверді відкладення не перестають утворюватися. Як правило, після здійснення 1-3 повторів, зокрема, уже після одного повтору, не потрібно додаткових повторів стадій низькошвидкісного центрифугування з наступним відкиданням необов'язково отриманих при цьому твердих відкладень. В одному з варіантів здійснення винаходу тверде відкладення, отримане при здійсненні стадії б) способу, може являти собою осад.

В одному з варіантів здійснення винаходу здійснюють відмивання відкладення, отриманого на стадіях низькошвидкісного центрифугування, перед його відкиданням один раз або більше, наприклад, 1-3 рази, за допомогою придатної рідини для відмивання. Придатною рідиною для відмивання може служити, наприклад, сам супернатант експериментального зразка панкреатину, отриманий після низькошвидкісного центрифугування, що потім можна застосовувати на стадії г) способу. Якщо рідина для відмивання відмінна від супернатанта експериментального зразка панкреатину, то після завершення відмивання відкладення її поєднують із супернатантом експериментального зразка панкреатину й потім використовують на стадії г) способу. Найбільше переважно здійснювати відмивання відкладення зазначеним вище чином перед здійсненням стадії г) способу в тому випадку, коли вірусне навантаження зразка панкреатину являє собою EMCV.

Конкретним варіантом здійснення винаходу є також супернатант експериментального зразка панкреатину, який можна одержувати відповідно до зазначеного вище стадіям а)-в) способу.

Як середовище зі східчастим градієнтом для стадії г) способу, як правило, використовують східчастий двофазний градієнт сахарози. Середовище зі східчастим градієнтом переважно являє собою градієнт, отриманий за допомогою 50% (мас./об.) забуференого розчину сахарози й 20% (мас./об.) забуференого розчину сахарози. Як буфер для розчинів сахарози можна застосовувати, наприклад, нейтральні буфери (тобто буфери зі значенням рН приблизно 7). Переважно застосовують буфер ЗФР («забуферений фосфатом фізіологічний розчин», рН 7,2). Як правило, використовують

стерильні середовища із градієнтом. Двофазний східчастий градієнт сахарози зазначеного вище типу забезпечує найбільш придатні умови для осадження й отже для виділення вірусів, які можуть бути виявлені. Крім того, східчасті градієнти сахарози, насамперед отримані як зазначено вище за допомогою 50% (мас./об.) необов'язково забуференого розчину сахарози й 20% (мас./про) забуференого розчину сахарози, створюють придатні осмотичні умови, які не приводять до дезактивації будь-якого присутнього вірусного навантаження. Ультрацентрифугування, здійснюване на стадії г) способу, гарантує, наприклад, що вірусне навантаження, джерелом якого є зразок панкреатину, практично кількісно переноситься із супернатанта експериментального зразка панкреатину в середовище зі східчастим градієнтом. Поняття «практично кількісно» у цьому випадку означає, що вірусне навантаження, що спочатку втримується в експериментальному зразку, виділяється настільки повністю, що різниця між титром вихідного вірусного навантаження й титром вірусного навантаження, виділеного в результаті ультрацентрифугування, дорівнює або становить менш половини одиниці десятичного логарифма титру вірусу (0,5 log - одиниці). Крім того, ультрацентрифугування відповідно до стадії г) способу гарантує, що вірусне навантаження переноситься в цільову фракцію, достатньо вилучену від експериментального зразка панкреатину, щоб можна було механічно відокремити її від експериментального зразка панкреатину без якого-небудь повторного змішання фаз, що порушує необхідне відділення.

Стадію г) способу звичайно здійснюють шляхом внесення в ультрацентрифужну пробірку взятого в певному обсязі середовища для градієнтного центрифугування (градієнтного середовища) з найбільшою концентрацією, на яку нашаровують узяті в певному обсязі градієнтні середовища з наступними більше низькими концентраціями. Цей процес повторюють стільки разів, скільки необхідно для одержання багатофазного градієнтного середовища, де кінцевий (верхній) шар являє собою обсяг рідкого експериментального зразка панкреатину, з якого потрібно виділити вірусне навантаження. У випадку двофазного градієнтного середовища на обсяг градієнтного середовища з наступною більше низькою концентрацією відразу нашаровують обсяг рідкого експериментального зразка панкреатину або суспензії експериментального зразка панкреатину (обсяг експериментального зразка панкреатину), придатного для центрифугування. У випадку двофазного градієнтного середовища це дозволяє створювати у ультрацентрифужній пробірці наступну послідовність фаз (зверху вниз): перший шар, що представляє собою обсяг експериментального зразка панкреатину (верхній шар), потім обсяг градієнтного середовища з найменшою концентрацією (середній шар, наприклад, що представляє собою 20% (мас./об.) забуферений розчин сахарози) і, нарешті, обсяг градієнтного середовища з найбільшою концентрацією (нижній шар, що покриває дно ультрацентрифужної пробірки; наприклад, 50%

(мас./об.) забуферений розчин сахарози). При на- шаровуванні індивідуальних обсягів необхідно дотримуватися обережності для того, щоб гарантувати, що на відповідних границях не виникало турбулентності або перемішування.

Цільова фракція, використовувана на стадії г) способу, як правило, являє собою (I) частину градієнтного середовища з найменшою концентрацією, що достатньо вилучена й відділена від обсягу експериментального зразка панкреатину, і (II) весь обсяг градієнтного середовища з наступною більше високою концентрацією. У випадку двофазного градієнтного середовища цільова фракція являє собою, наприклад, частину градієнтного середовища з найменшою концентрацією, що достатньо вилучена й відділена від обсягу експериментального зразка панкреатину, і весь обсяг градієнтного середовища з наступною більше високою концентрацією, що простирається до дна ультрацентрифужної пробірки.

При розрахунку положення цільової фракції, що достатньо вилучена від обсягу експериментального зразка панкреатину для того, щоб можна було здійснювати наступний поділ, варто мати, що одержувані розрахунком значення для положення часток (тобто положення вірусних часток, виділених зі зразка панкреатину), як правило, відповідають вершині гауссовського розподілу. У такому випадку частки повинні бути розподілені як вище, так і нижче їхній отриманих розрахунком положенням. Таким чином, при визначенні необхідної відстані цільової фракції від обсягу експериментального зразка панкреатину необхідно брати додатковий запас для обліку гауссовського розподілу положень часток. Вірусне навантаження звичайно переносять у цільову фракцію, що достатньо вилучена від обсягу експериментального зразка панкреатину для того, щоб можна було здійснювати наступний поділ, якщо частки, що характеризуються константою седиментації, що становить ≥ 120 S, зокрема від ≥ 120 S до 5000 S, мігрували внаслідок ультрацентрифугування з обсягу експериментального зразка панкреатину щонайменше на 10 мм, наприклад, щонайменше на 15 мм, щонайменше на 20 мм, щонайменше на 25 мм або щонайменше на 30 мм у градієнтне середовище з найменшою концентрацією. У випадку описаного вище двофазного градієнтного середовища градієнтне середовище з найменшою концентрацією являє собою 20% (мас./об.) забуферений розчин сахарози. В одному з варіантів здійснення стадії ультрацентрифугування практично всі частки, що характеризуються константою седиментації, що становить ≥ 120 S, зокрема, що становить від ≥ 120 S до 5000 S, повністю проходили через градієнтне середовище з найменшою концентрацією й концентрувалися в прикордонному шарі, що примикає до градієнтного середовища з наступною більше високою концентрацією (тобто на «сахарозній подушці»). Фахівець у даній галузі повинен мати відомості про придатні методи розрахунку й уміти застосовувати відповідні умови для ультрацентрифугування. Придатні умови для ультрацентрифугування можна визначати на основі характеристик вірусу (iv), що підлягає (ix) виділенню зі зразка

панкреатину (наприклад, щільності й константи седиментації), при цьому мається на увазі, що можна застосовувати відомі *per se* спрощення (див., наприклад, Lebowitz і ін., «Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review»; Protein Science 11, 2002, сс. 2067-2079).

При умові, що ультрацентрифугування здійснюють із використанням звичайних об'ємних співвідношень і в середовищі для східчастого градієнтного ультрацентрифугування, переважно у двофазному східчастому градієнті сахарози, вірусне навантаження, як правило, транспортують у цільову фракцію, придатну для наступного виділення, здійснюючи ультрацентрифугування протягом щонайменше 1 год, як правило, щонайменше год 4, наприклад, протягом 2-8 год, зокрема, протягом 3-6 год. Придатна відносна відцентрова сила для ультрацентрифугування, пропонованого у винаході, становить щонайменше 100000×g, наприклад, 200000-350000×g. В одному з варіантів здійснення стадії ультрацентрифугування зазначену стадію здійснюють протягом 3-6 год при відносній відцентровій силі, що становить 200000-350000×g, в об'ємних співвідношеннях, звичайно застосовуваних для ультрацентрифугування, і в градієнті, отриманому з використанням 50% (мас./об.) забуференого розчин сахарози й 20% (мас./об.) забуференого розчину сахарози. В іншому варіанті здійснення стадії ультрацентрифугування зазначену стадію здійснюють протягом 3,5-4,5 год при відносній відцентровій силі, що становить 200000-300000×g, в об'ємних співвідношеннях, звичайно застосовуваних для ультрацентрифугування, і в градієнті, отриманому з використанням 50% (мас./об.) забуференого розчин сахарози й 20% (мас./об.) забуференого розчину сахарози. Об'ємні співвідношення, звичайно застосовувані для ультрацентрифугування, одержують, наприклад, у тому випадку, коли застосовують звичайні ультрацентрифужні пробірки. Звичайними ультрацентрифужними пробірками в цьому випадку є пробірки які мають обсяг 10-15 мл, зокрема, 12-13 мл; внутрішній радіус 6-8 мм, зокрема, 7 мм, і висоту 80-100 мм, зокрема, 85-95 мм. У тому випадку, коли на стадії г) способу використовують звичайну ультрацентрифужну пробірку, обсяг середовища для градієнтного ультрацентрифугування з найбільшою концентрацією (наприклад, 50% (мас./об.)-ного забуференого розчину сахарози) може становити, наприклад, 0,5 мол, обсяг градієнтного середовища з наступною більше низькою концентрацією (наприклад, 20% (мас./об.)-ного забуференого розчину сахарози) може становити, наприклад, 4,5 мол, і обсяг експериментального зразка панкреатину може становити, наприклад, 5 мол.

У кращому варіанті здійснення стадії г) способу поза залежністю від інших обраних умов ультрацентрифугування здійснюють при охолодженні до температури 0-15°C, переважно до температури 4-10°C

На цій стадії способу можна застосовувати звичайні охолоджувані центрифуги, відомі фахівцям в даній галузі. Для стадії г) способу, як правило, застосовують звичайну наявну на ринку ульт-

рацентрифугу, таку як охолоджувана ультрацентрифуга з ротором з хитними склянками, наприклад, ультрацентрифуга Sorvall® з ротором з хитними склянками моделі «TH-641».

Фахівець у даній галузі, опираючись, насамперед на додаткову технічну інформацію, наведену в описі даного винаходу, може підвищувати або знижувати масштаб описаних вище стадій низькошвидкісного центрифугування й стадій ультрацентрифугування в будь-якому необхідному ступені.

На стадії д) способу цільову фракцію, що містить вірусне навантаження, кількісно виділяють із супернатанта експериментального зразка панкреатину. Виділення, як правило, здійснюють, установлюючи мітку на ультрацентрифужну пробірку на попередньо певній висоті границі фракції-мішені. Потім весь обсяг, що перебуває вище цієї границі, видаляють від обсягу, що залишився, наприклад, шляхом аспірації. Аспірацію можна здійснювати, наприклад, за допомогою звичайного шлангового насоса, трубопроводу й капілярів, які перед цим варто піддати стерилізації. Придатна швидкість відкачки становить, наприклад, 2 мл/хв. У процесі аспірації варто вживати заходів для того, щоб капіляр шлангового насоса завжди перебував на верхній границі рідини. Цільову фракцію, що залишилася в ультрацентрифужній пробірці, можна потім видаляти з ультрацентрифужної пробірки відомим *per se* методом за допомогою звичайної одноканальної піпетки, переважно зі стерильним кінцем. У цей же час можна видаляти будь-який осад, що усе ще залишається в ультрацентрифужній пробірці, наприклад, шляхом повторного усмоктування й ресуспендування з використанням одноканальної піпетки.

Один з варіантів здійснення винаходу відноситься також до виділеної цільової фракції, яку можна одержувати за допомогою стадій а)-д) способу.

Якщо потрібно здійснювати спосіб кількісного визначення вірусного навантаження в зразку панкреатину, то після стадії д) способу варто здійснювати стадію е) способу. На стадії е) способу вірусне навантаження в зразку панкреатину кількісно визначають шляхом визначення титру вірусної інфекції в цільовій фракції, що містить вірусне навантаження. У цьому випадку кількісне визначення титру вірусної інфекції в цільовій фракції можна здійснювати згідно додатковим процедурам, відомим *per se* у вірусології, наприклад, за допомогою відомого *per se* принципу визначення титру вірусної інфекції (VITD).

Можна, наприклад, розводити цільову фракцію у відповідному співвідношенні придатним середовищем для культивування клітин для одержання експериментального зразка, призначеного для визначення вірусу. Як придатні середовища для культивування клітин можна використати зазначені вище середовища, у кожному випадку відповідним досліджуваным видам вірусів. В одному з варіантів здійснення винаходу для виключення помилкових позитивних реакцій на присутність вірусної інфекції розведену або нерозведену цільову фракцію можна фільтрувати через мікрофільтр перед кіль-

кісним визначенням вірусного навантаження на стадії е).

Придатне розведення можна одержувати, наприклад, шляхом розведення цільової фракції середовищем для культивування клітин до первісного обсягу супернатанта експериментального зразка панкреатину, використаного на стадії г) способу. Потім як перший крок можна спочатку наготовлювати відомим *per se* методом серійні розведення експериментальних зразків, призначених для визначення вірусу, наприклад, з використанням коефіцієнтів розведення 1:2, 1:5 або 1:10 або також комбінацій зазначених коефіцієнтів розведення, для здійснення кількісного VITD. Потім як другий крок можна здійснювати відомим *per se* методом інокуляцію придатної суспензії клітин експериментальними зразками, призначеними для визначення вірусу, що мають різні концентрації із серійних розведень, після чого дають сформуватися шару клітин на призначених для визначення вірусу експериментальних зразках з різними концентраціями. Після цього для виключення помилкових позитивних реакцій на наявність вірусної інфекції, які можуть бути обумовлені присутністю мікроорганізмів, таких як інертні бактерії або мікоплазми, як правило, доцільно здійснювати фільтрацію експериментальних зразків, призначених для визначення вірусу, перед здійсненням інокуляції ними клітин-детекторів. Для цієї мети експериментальний зразок, призначений для визначення вірусу, або розведений експериментальний зразок, призначений для визначення вірусу, можна фільтрувати через фільтр із відповідним розміром пор, такий як мікрофільтр, наприклад, мікрофільтр із розміром пор від 0,1 до 10 мкм (включаючи границі зазначеного діапазону; мікрофільтрація), як правило, мікрофільтр із розміром пор 1 мкм. Потім фільтрат можна використати як експериментальний зразок для подальших досліджень. Після цього як третій крок інокульовані експериментальні зразки аналізують (прочитують) для визначення рівня інфекції за допомогою методу, що залежить від типу інфекції. Коли, наприклад, можна використати CPE як індикатор зараження шару клітин, то CPE визначають відомим *per se* за методом після закінчення приблизно 4-7 днів. Титування (за методом кінцевих розведень) експериментальних зразків, призначених для визначення вірусу, дозволяють у цьому випадку кількісно визначати присутню у вихідному зразку дозу, що інфікує. Титування звичайно здійснюють шляхом розведення з коефіцієнтів 10, тобто на основі десятикової логарифмічної шкали. На практиці звичайно розраховують середню (50%) дозу, що інфікує (ID_{50}). У випадку декількох паралельних партій виявлене значення ID_{50} відповідає найбільшому (зворотна величина) розведенню експериментального зразка, призначеного для визначення вірусу, при якому CPE можна виявити рівно в половині партій. Результати необов'язково можна додатково коректувати або інтерполювати відомим *per se* за допомогою комп'ютера. Найбільше широко розповсюдженими методами розрахунку титрів вірусів є методи Спірмана й Карбера (див. С. Spearman, Br. J. Psychol. 2, 1908, сс. 227-242, і G. Karber,

Arch. Exp. Path. Pharmac. 162, 1931, ss. 480-483; а також Bundesanzeiger [Federal gazette] № 84, 4 травня 1994 р.) або Reed і Muench (див. Reed L.J., Muench H., Am. J. Hyg. 27, 1938, ss. 493-497).

Можна використовувати також інші індикатори зараження клітинного шару, такі, наприклад, як індукція вірусного антигену або індукція бляшки. Фахівцям в даній галузі відомі такі методи і їхні застосування для розглянутого випадку, наприклад, вони описані в таких підручниках по вірусології, як H.W. Doerr і W.H. Gerlich, «Medizinische Virologie», з Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1-е вид, 2002 р., або в більше сучасних виданнях цієї книги.

Приклади

Всі процедури, зазначені в наведених нижче прикладах, здійснювали в стерильних умовах на стерильному лабораторному столі. Необхідно дотримуватися всіх процедур, які звичайно застосовують у вірусологічних лабораторіях, наприклад, процедури, що забезпечують безпеку. Застосовували, серед іншого, наступні матеріали:

1. Розчин антибіотиків, 1,0 г стрептоміцину сульфату й 1,2 г пеніциліну розчиняли в 20 мл двічі дистильованої води й фільтрували через фільтр із розмірами пор 0,2 мкм. Потім фільтрат розділяли на аліквотів обсягом по 1 мл і необов'язково зберігали при - 20°C до використання;

2. Середовище Дульбекко, середовище для культур клітин, що використали для клітин лінії SK 6, клітин лінії SPEV і клітин лінії MA 104;

3. Одноканальні піпетки зі стерильними кінцями;

4. FCS, фетальна теляча сироватка, що одержували від фірми Bio Whittaker (сироватка);

5. Колби для культур тканин, стерильні, площа дна колби становила в кожному випадку 25, 75 або 175 см²;

6. MEM, середовище для культур тканин, доповнене 1,5 г/л бікарбонату натрію й 1 мм піруватом, що використали для клітин лінії PK-15;

7. Титраційні мікропланшети, стерильні, 96-ямкові із кришкою;

8. Суспензія PAN, 10%-на суспензія, панкреатину; відважували 1,0 г свинячого панкреатину (якщо не зазначене інше) у стерильних умовах і вносили в лабораторну склянку, поєднували з 1 мл розчину антибіотиків і (якщо не зазначене інше) з 8,0 мл конкретного відповідного середовища для клітинних культур і (якщо не зазначене інше) суспендували протягом 60 хв у крижаній лазні при перемішуванні;

9. Буфер Pardee, буфер Pardee, що містить диоксид вуглецю;

10. ЗФР, стерильний «забуферений фосфатом фізіологічний розчин» (р 7,2);

11. Піпетки, стерильні;

12. Наконечники для піпеток, стерильні в стерильних піддонах;

13. Пластикові мішки, непроникні для CO₂, поставлені застілкою («Anaerocult®» фірми Merck);

14. Поліклональне антитіло до PPV, кон'югované із флуоресцеїнізотіоціанатом (ФІТЦ), одержували від фірми NatuTec GmbH;

15. Пробірки, стерильні обсягом 15 і 50 мл;

16. Розчин сахарози, 20%, забуферений ЗФР, стерильний; концентрацію регулювали відомим *per se* методом за допомогою звичайного рефрактометра;

17. Розчин сахарози, 50%, забуферений ЗФР, стерильний; концентрацію регулювали відомим *per se* методом за допомогою звичайного рефрактометра;

18. Пробірки із кришкою, що загвинчується, стерильні;

19. Розчин трипсину, «Tryp Express®», одержували від фірми INVITROGEN;

20. Шланговий насос, одержували від фірми «ismaTec», швидкість накачування аж до 5,8 мл/хв;

21. Охолоджувана ультрацентрифуга, «Sorvall® Pro 80» з ротором типу «TH-641»;

22. Ультрацентрифужні пробірки, стерильні місткістю 11 мл, розміри 9×90 мм;

23. Блоки для розведень, 96-ямкові місткістю по 1,0 мл/лунку;

24. Клітини лінії MA-104: одержували від фірми FLI;

25. Клітини лінії PK-15: одержували від фірми DARD;

26. Клітини лінії SK-6: одержували від фірми FLI;

27. Клітини лінії SPEV: одержували від фірми FLI;

28. Суспензії клітин ліній SK 6, SPEV і PK-15, призначені для тестування, що містять в 200000 клітин/мл у середовищі для культур клітин, доповненій 10% FCS;

29. Стерильні пробірки типу Falcon місткістю 15 мл

Приклад 1: Дослідження шкідливого впливу панкреатину на різні лінії клітин

При проведенні виявлення вірусів у матеріалі експериментальних зразків з використанням клітинних культур необхідно оцінювати шкідливий вплив підлягаючого вивченню зразка панкреатину на клітини для того, щоб мати можливість виключити помилкові негативні результати при оцінці CPE. Тому були проведені описані нижче дослідження з оцінки шкідливого впливу суспензії експериментального зразка панкреатину на різні лінії клітин.

Для тестування шкідливого впливу брали порції суспензії PAN обсягом по 0,5 мл, що означали як «експериментальний зразок суспензії панкреатину».

Низькошвидкісне центрифугування: частину, що залишилася, суспензії PAN центрифугували протягом 15 хв при 4000 об/хв (2700×g) і 4°C у звичайній охолоджуваній центрифугі (Megafuge® 1.0R Heraeus SEPATECH® з ротором з хитними склянками № 2704). Після низькошвидкісного центрифугування супернатант центрифугували ще протягом 15 хв при 4000 об/хв і 4°C і позначали його як «супернатант, отриманий після низькошвидкісного центрифугування», що застосовували для титрування вірусу й ультрацентрифугування. Два осади, отримані в кожному випадку після низькошвидкісного центрифугування, поєднували (загальний обсяг 1 мл), ресуспендували в 9 мл

відповідного придатного середовища для культур клітин і означали як «осад».

Ультрацентрифугування: з експериментально-го зразка «супернатанта, отриманого після низькошвидкісного центрифугування» відбирали 5,0 мл і піддавали ультрацентрифугуванню на ультрацентрифузі. Для цієї мети вносили за допомогою піпетки по 0,5 мл 50%-ного розчину сахарози в таку кількість ультрацентрифужних пробірок, що було потрібно для здійснення тестування. Тримуючи ультрацентрифужну пробірку під нахилом, на цей шар обережно нашаровували 4,5 мл 20%-ного розчину сахарози, між двома розчинами утворювався помітний поділяючий шар. Потім також обережно й уникаючи турбулентності й перемішування на 20%-ний розчин сахарози нашаровували шар узятого як описано вище експериментального зразка «супернатанта, отриманого після низькошвидкісного центрифугування», обсягом 5,0 мл. Після цього ультрацентрифужні пробірки підвішували в ультрацентрифужний ротор. Для цієї мети в кожному випадку дві ультрацентрифужні пробірки на протилежних сторонах ротора врівноважували за допомогою ЗФР, вставляли у відповідних держакі і щільно закривали прикладеної до пробірки кришкою. Після установки держаків у ротор експериментальні зразки центрифугували протягом 4 год при 10°C і 40000 об/хв (273799×g). Після ультрацентрифугування ультрацентрифужні пробірки виймали із держаків на стерильному лабораторному столі й наносили мітку на висоті 1,5 см від дна ультрацентрифужної пробірки. За допомогою шлангового насоса, трубопроводу й капілярів, які попередньо були простерилізованими, рідину, що перебуває вище мітки, видаляли шляхом аспірації з ультрацентрифужної пробірки при швидкості відкачування 2 мл/хв, при цьому капіляр завжди перебував на верхній границі рідини. Цю отриману в такий спосіб першу фракцію означали як «верхня фракція після ультрацентрифугування». «Нижню фракцію після ультрацентрифугування» (1,5 мл), що залишилася в ультрацентрифужній пробірці, у кожному випадку видаляли з ультрацентрифужної пробірки за допомогою одноканальної піпетки. Будь-який осад, що міг залишитися на дні ультрацентрифужної пробірки, ресуспендували шляхом повторного усмокування за допомогою одноканальної піпетки й також видаляли. Обсяг «нижньої фракції після ультрацентрифугування» доводили в стерильній градуйованій пробірці за допомогою відповідного придатного середовища для культур клітин до 5,0 мл, що відповідало первісному обсягу аналізованого експериментального зразка, що містить вірус. До здійснення наступної обробки дві отримані в такий спосіб фракції зберігали при 4°C або, як у випадку тривалого зберігання, при - 20°C.

Потім тест-зразки, що представляють собою «тест-зразок суспензії панкреатину», «супернатант після низькошвидкісного центрифугування», «осад» (після низькошвидкісного центрифугування), «верхню фракцію після ультрацентрифугування» і «нижню фракцію після ультрацентрифугування» (після доведення обсягу до 5,0 мл), тестували у відношенні їхнього шкідливого впливу на різні лінії клітин. Для цього наготовлювали в кожному випадку серійні розведення експериментальних зразків. Всі призначені для тестування експериментальні зразки піддавали додатковому розведенню з коефіцієнтом 2, починаючи з розведення 1:5, за допомогою відповідного придатного середовища для культур клітин. У титраційні мікропланшети додавали в 8 повторностях порції по 100 мкл на лунку суспензії клітин, що містить клітини лінії PK-15, SPEV або SK 6, у кожному випадку 100 мкл отриманих розведень експериментальних зразків до 100 мкл свіжоотриманій суспензії клітин. Коли тестували клітини лінії MA 104, то використали титраційні мікропланшети із шаром клітин, нанесеним за 24 год до цього. Для цієї мети в кожному випадку середовище для культур клітин видаляли з лунок і заміняли 100 мкл свіжого середовища для культур клітин, не утримуючого сироватку, одержуючи кінцеві розведення експериментального зразка 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 і т. д. Як контроль у вісім лунок кожного титраційного мікропланшета вносили по 100 мкл середовища для культур клітин замість 100 мкл серійних розведень. Пари планшетів разом із пробіркою, що містить 4 мл буфера Pardee, і фільтрувальним папером поміщали в повітронепроникні пакети й щільно закривали за допомогою закриваючого затиску. Потім планшети інкубували при 36±1°C протягом періоду часу аж до 7 днів. Протягом періоду інкубації планшети щодня обстежували за допомогою мікроскопа відносно рівня CPE, тобто відносно лізису клітин і/або дегенерації клітин і відсутності утворення шару клітин у результаті шкідливого впливу панкреатину. Кінцеве обстеження проводили через сім днів. Титрування повторювали в тому випадку, якщо дегенерацію клітин уже виявляли в контролях при здійсненні кінцевого зчитування.

В наведеній нижче таблиці 1 представлені результати тестування різних експериментальних зразків у відношенні їхнього шкідливого впливу на різні лінії клітин. Якщо експериментальний зразок робив шкідливий вплив аж до кінцевого розведення, наприклад, що становить 1:640, але не робив шкідливого впливу в розведенні 1:1280, то відповідний результат для цього зразка зазначений у таблиці як «зразок робить шкідливий вплив при ≥1:640, але <1:1280».

Таблиця 1

Результати тестування суспензій панкреатину
і їх підфракцій відносно шкідливого впливу на різні лінії клітин

Лінії клітин	PK-15	MA-104	SK 6	SPEV
Експериментальні зразки	Зразок робить шкідливий вплив аж до розведення:			
експериментальний зразок суспензії панкреатину	≥1:640 <1:1280	≥1:160 <1:320	≥1:320 <1:640	≥1:320 <1: 640
супернатант після низькошвидкісного центрифугування	≥1:640 <1:1280	≥1:160 <1:320	≥1:320 <1:640	≥1:320 <1: 640
осад	≥1:160 <1:320	≥1:80 <1:160	≥1:80 <1:160	≥1:40 <1:80
верхня фракція після ультрацентрифугування	≥1:320 <1:640	≥1:160 <1:320	≥1:320 <1:640	≥1:320 <1: 640
нижня фракція після ультрацентрифугування	≥1:40 <1:80	≥1:20 <1:40	≥1:20 <1:40	≥1:20 <1:40

Результати, представлені в таблиці 1, чітко свідчать про те, що «нижня фракція після ультрацентрифугування», що піддавали стадії ультрацентрифугування відповідно до винаходу й у якій була сконцентровано вірусне навантаження, мала істотно менший шкідливий вплив на досліджені лінії клітин у порівнянні з іншими дослідженими експериментальними зразками.

Якщо порівнювати шкідливий вплив експериментального зразка неопрацьованої суспензії панкреатину із впливом нижніх фракцій після ультрацентрифугування, то можна бачити, що в описаному вище тесті шкідливий вплив зменшувався в 8 разів відносно клітин лінії MA-104 і в 16 разів у відношенні кожної із трьох інших тестованих ліній клітин. Супернатант ще залишався злегка мутним після того, як експериментальний зразок суспензії панкреатину двічі піддавали низькошвидкісному центрифугуванню. У процесі ультрацентрифугування ці нерозчинні частки осаджувалися у вигляді тонкого відкладення на дні ультрацентрифужної пробірки. Це відкладення також піддавали ресуспендуванню й воно входило до складу «нижньої фракції після ультрацентрифугування». Таким чином, можна припускати, що це відкладення вносить вклад у залишковий шкідливий вплив «нижньої фракції після ультрацентрифугування» і що його залишковий шкідливий вплив можна ще більше зменшити шляхом видалення, не здійснюючи більше ресуспендування зазначеного вище відкладення.

Приклад 2 : Дослідження зразків панкреатину з додаванням більше високого титру вірусу

Ціль досліджень зразків панкреатину з додаванням більше високого титру вірусу («тести з високим рівнем внесеного вірусу» (high - spike - тести)) полягала, серед іншого, у тому, щоб продемонструвати, що спосіб, пропонується у винаході, можна застосовувати для кількісного виділення вірусного навантаження зі зразка панкреатину і його компонентів, які можуть впливати на живі клітини. Для цієї мети для кожного призначеного для дослідження вірусу наготовлювали відомим методом «препарати із внесеним вірусом», що мають високий титр. У контексті даного

опису «високий титр» у кожному конкретному випадку (залежно від застосовуваного виду вірусу) означає титр препарату із внесеним вірусом, що дорівнює щонайменше 4 одиницям десяткового логарифма (log) середньої «цитопатогенної дози для тихорецької культури» на мл досліджуваного експериментального зразка (TCID₅₀/мл). Препарати із внесеним PCV з високим титром можна наготовлювати відповідно до методу, описаному в I. Tischer і ін., Arch. Virol. 96, 1987, сс. 39-57, шляхом попередньої обробки використовуваних для культивування клітин лінії PK-15 розчином D-(+)-глюкозаміна.

а. Тести з високим рівнем внесеного EMCV (штам LC 75)

0,75 мл препарату із внесеним EMCV (штам LC 75) з високим титром (7,70±0,10 log TCID₅₀/мл) і 0,75 мл розчину антибіотиків додавали до суспензії PAN (отриманої шляхом додавання 4,5 мл середовища Дульбекко до 0,75 м панкреатину й перемішування протягом 50 хв при охолодженні на льоді) і суспензію, що утворилася, перемішували ще протягом 10 хв. Для титрування вірусу брали 0,5 мл цієї суспензії й поміщали на зберігання при 4°C до здійснення титрування («фракція 1 з високим титром EMCV»). Частину суспензії, що залишилася, центрифугували протягом 15 хв при 4000 об/хв (2700×g) і 4°C. Отриманий після центрифугування супернатант повторно центрифугували в новій центрифужній пробірці протягом 15 хв при 4°C і 4000 об/хв. Після другого центрифугування супернатант кількісно переносили в стерильну пробірку («фракція 2 з високим титром EMCV»). Два осади після низькошвидкісного центрифугування ресуспендували за допомогою 6,5 мл середовища Дульбекко, поєднували й повторно центрифугували протягом 15 хв при 4000 об/хв і 4°C. Отриманий супернатант переносили в стерильну пробірку. Відмивання осаду повторювали ще двічі, використовуючи щораз порції по 6,5 мл свіжого середовища Дульбекко. Три розчини для відмивання поєднували й використали для титрування вірусу («фракція 3 з високим титром EMCV»). Після трьох відмивань осад ресуспендували в 6,5

мл середовища Дульбекко й потім титрували («фракція 4 з високим титром EMCV»).

5,0 мл «фракції 2 з високим титром EMCV» піддавали ультрацентрифугуванню в східчастому градієнті сахарози як описано вище в прикладі 1. Після ультрацентрифугування одержували окремо верхню («фракція 5 з високим титром EMCV») і нижню («фракція 6 з високим титром EMCV») фракції й здійснювали титрування.

Наготовлювали серійні розведення вірусу з коефіцієнтом розведення 3 і переносили кожне з 12-кратних розведень в 12 паралельних лунок на титраційні мікропланшети, що містять суспензію клітин лінії SPEV. Внесений вірус - титрування з розведення 10^{-3} ; фракція 1 з високим титром EMCV-титрування з розведення 10^{-2} ; фракція 2 з

високим титром EMCV - титрування з розведення 10^{-2} ; фракція 4 з високим титром EMCV - титрування з розведення 10^{-1} ; фракція 3 з високим титром EMCV - титрування з розведення 10^{-2} ; фракція 5 з високим титром EMCV - титрування з нерозведеного експериментального зразка; фракція 6 з високим титром EMCV - титрування в трьох повторностях з розведення 10^{-3} .

Титраційні мікропланшети інкубували при $36\pm 1^\circ\text{C}$ в атмосфері, що містить приблизно 5% CO_2 , і по витікання 6-7 днів обстежили за допомогою мікроскопа відносно розвитку CPE у лунках. Титр розраховували в експериментальних зразках відповідно до методу Спірмана - Карбера. Результати, отримані в тесті з високим рівнем внесеного EMCV, представлені нижче в таблиці 2.

Таблиця 2

Результати, отримані в тесті з високим рівнем внесеного EMCV у суспензіях панкреатину

Експериментальний зразок	Титр $\log \text{TC ID}_{50}/\text{мл}$ ¹⁾	Обсяг експериментального зразка [мл]	Вірусне навантаження [$\log \text{TC ID}_{50}/\text{мл} + \log \text{обсягу}$] ²⁾
внесений вірус (EMCV)	$7,70\pm 0,10$	0,75	$7,58\pm 0,20$
фракція 1 з високим титром EMCV	$7,14\pm 0,10$	7,5	$8,02\pm 0,20$
фракція 2 з високим титром EMCV	$7,38\pm 0,09$	5	$8,08\pm 0,18$
фракція 4 з високим титром EMCV	$3,32\pm 0,08$	7,5	$4,20\pm 0,16$
фракція 3 з високим титром EMCV	$5,67\pm 0,10$	19,5	$6,96\pm 0,20$
фракція 5 з високим титром EMCV	$4,71\pm 0,10$	8,5	$5,64\pm 0,20$
фракція 6 з високим титром EMCV (1)	$6,99\pm 0,11$	5	$7,69\pm 0,22$
фракція 6 з високим титром EMCV (2)	$7,07\pm 0,10$	5	$7,77\pm 0,20$
фракція 6 з високим титром EMCV (3)	$6,99\pm 0,10$	5	$7,69\pm 0,20$
середнє значення для 3 фракцій 6 з високим титром EMCV ³⁾	$7,02\pm 0,05$	5	$7,72\pm 0,10$

¹⁾ Величина представлена із вказівкою стандартного відхилення для індивідуального титрування; ²⁾ Величина представлена із вказівкою 95%-ного довірчого інтервалу; ³⁾ Величина представлена із вказівкою стандартного відхилення по 3 визначенням.

З даних, представлених у таблиці 2, видно, що при здійсненні способу, запропонованого у винаході, вірусне навантаження в не опрацьованих зразках для тесту з високим рівнем внесеного вірусу (фракції 1 і 2 з високим титром EMCV) з урахуванням звичайно прийнятого діапазону варіацій, що становить $0,5 \log$ - одиниць, виявилось можливим щонайменше майже кількісно виділити з нижньої фракції після ультрацентрифугування (фракція 6 з високим титром EMCV). Крім того, з результатів тесту можна укласти також, що сам зразок панкреатину не робив інгібуючої або інактивуючої дії на EMCV.

б. Тести з високим рівнем уведеного парвовірусу свиней

Парвовірус свиней (PPV) можна культивувати в зростаючих клітках лінії SK 6. Якщо вихід вірусу виявляється занадто низьким, то після культивування вірус концентрують.

1,0 мл препарату з уведенням вірусом PPV з високим титром ($4,75\pm 0,06 \log \text{TC ID}_{50}/\text{мл}$) додавали до суспензії PAN (яку наготовлювали шляхом додавання 7,0 мл середовища Дульбекко й перемішування в плинні 50 хв при охолодженні на льоді) і суспензію, що утворилася, перемішували ще

протягом 10 хв. Відбирали 0,5 мл цієї суспензії для титрування вірусу й поміщали на зберігання при 4°C до здійснення титрування («фракція 1 з високим титром PPV»). Частину суспензії, що залишилася, центрифугували протягом 15 хв при 4000 об/хв ($2700\times g$) і 4°C . Отриманий після центрифугування супернатант піддавали повторному центрифугуванню в новій центрифужній пробірці протягом 15 хв при 4°C і 4000 об/хв. Супернатант після другого центрифугування кількісно переносили в стерильну пробірку («фракція 2 з високим титром PPV»). Два осади після низькошвидкісного центрифугування ресуспендували, використовуючи в цілому 9 мл середовища Дульбекко, поєднували й повторно центрифугували протягом 15 хв при 4000 об/хв і 4°C . Супернатант, що утворився переносили в стерильну пробірку. Відмивання осаду повторювали двічі, використовуючи щораз порції по 9 мл свіжого середовища Дульбекко. Після цього три розчини, що застосовувалися для відмивання, поєднували й використали для титрування вірусу («фракція 3 з високим титром PPV»). Після трьох відмивань осад ресуспендували в 9 мл середовища Дульбекко й потім титрували («фракція 4 з високим титром PPV»).

5,0 мл фракції 2 з високим титром PPV піддавали ультрацентрифугуванню в східчастому градієнті сахарози як описано вище в прикладі 1. Після ультрацентрифугування одержували окремо верхню («фракція 5 з високим титром PPV») і нижню («фракція 6 з високим титром PPV») фракції й титрували.

Наготовлювали серійні розведення вірусу з коефіцієнтом розведення 3 і переносили кожне з 12-кратних розведень в 12 паралельних лунок на титраційні мікропланшети, що містять суспензію клітин лінії SK 6. Титраційні мікропланшети інкубу-

вали при $36\pm 1^\circ\text{C}$ в атмосфері, що містить приблизно 5% CO_2 , і по витіканні 6-7 днів обстежили за допомогою мікроскопа відносно розвитку CPE у лунках. Після цього періоду інкубації планшети фіксували шляхом додавання охолодженої на льоді суміші ацетон/метанол і лунки з невизначеним CPE додатково інкубували для визначення кінцевого титру з міченим за допомогою ФІТЦ антитілом до PPV і потім обстежили за допомогою мікроскопа в УФ-променях. Титр розраховували в експериментальних зразках відповідно до методу Спирмана - Карбера.

Таблиця 3

Результати, отримані в тестах з високим рівнем внесеного PPV у суспензіях панкреатину

Експериментальний зразок	Титр $\log \text{TC ID}_{50}/\text{мл}$ ¹⁾	Обсяг експериментального зразка [мл]	Вірусне навантаження [$\log \text{TC ID}_{50}/\text{мл} + \log \text{обсягу}$] ²⁾
внесений вірус (PPV)	$4,95\pm 0,15$	1	$4,95\pm 0,30$
фракція 1 з високим титром PPV	$3,56\pm 0,08$	10	$4,56\pm 0,16$
фракція 2 з високим титром PPV	$4,47\pm 0,08$	5	$5,17\pm 0,16$
фракція 4 з високим титром PPV	$2,08\pm 0,11$	10	$3,08\pm 0,22$
фракція 3 з високим титром PPV	$2,38\pm 0,09$	27	$3,81\pm 0,18$
фракція 5 з високим титром PPV	$<3,15$	8,5	$<4,08$
фракція 6 з високим титром PPV (1)	$4,67\pm 0$	5	$5,37\pm 0$
фракція 6 з високим титром PPV (2)	$4,43\pm 0,08$	5	$5,13\pm 0,16$
фракція 6 з високим титром PPV (3)	$4,47\pm 0,08$	5	$5,17\pm 0,16$
Середнє значення для 3 фракцій 6 з високим титром PPV ³⁾	$4,52\pm 0,13$ ³⁾	5	$5,22\pm 0,26$

¹⁾ Величина представлена із вказівкою стандартного відхилення для індивідуального титрування; ²⁾ Величина представлена із вказівкою 95%-ного довірчого інтервалу; ³⁾ Величина представлена із вказівкою стандартного відхилення по 3 визначенням.

З даних, представлених у таблиці 3, видно, що як продемонстровано в експерименті з високим рівнем уведеного EMCV, при успішному здійсненні способу, пропонуваного у винаході, вірусне навантаження в неопрацьованих експериментальних зразках з високим рівнем уведеного вірусу (фракції 1 і 2 з високим титром PPV) з урахуванням звичайно прийнятого діапазону варіацій, що становить $0,5 \log$ - одиниць, виявилось можливим щонайменше майже кількісно виділити з нижньої фракції після ультрацентрифугування (фракція 6 з високим титром PPV). У фракції 1 з високим титром PPV, тобто в присутності нерозчинних часток, був виявлений на одну \log - одиницю менший титр PPV, чим у фракції 2 з високим титром PPV. Таким чином, очевидно, присутність нерозчинних часток порушує титрування. Крім того, з результатів тесту можна укласти також, що сам по собі зразок панкреатину не робив інгібуючої або інактивуючої дії на EMCV.

Приклад 3 : Дослідження зразків панкреатину з додаванням низького титру вірусу

Ціль досліджень зразків панкреатину з додаванням зниженого титру вірусу («тести з низьким рівнем внесеного вірусу» (low - spike - тести)) полягала, серед іншого, у тім, щоб оцінити межі виявлення способу, пропонуваного у винаході, для вірусу, використовуваного в кожному конкретному випадку. Кількісне виявлення вірусного наванта-

ження в індивідуальних експериментальних зразках зі зниженими титрами вірусу можна успішно здійснювати в тому випадку, якщо титр вірусу в препараті з вихідним доданим вірусом з урахуванням звичайно прийнятого діапазону варіацій, що становить $0,5 \log$ - одиниць, можна принаймні майже кількісно виявити в нижніх фракціях після ультрацентрифугування.

а. Тест із низьким рівнем уведеного EMCV

Наготовлювали суспензію PAN (що містить 2,5 г свинячого панкреатину, 2,5 мл розчини антибіотиків, 20 мл середовища Дульбекко). Тест із низьким рівнем уведеного вірусу здійснювали з дублюванням у вигляді незалежних друг від друга тестів:

Для першого тесту наготовлювали зазначені нижче партії, використовуючи суспензію PAN і розчин вірусу, що вводять, EMCV :

1) 4,5 мл суспензії панкреатину + 0,5 мл вірусу, що вводять, у розведенні 10-3; результуюче розведення 10-4;

2) 4,5 мл суспензії панкреатину + 0,5 мл вірусу, що вводять, у розведенні 10-4; результуюче розведення 10-5;

3) 4,5 мл суспензії панкреатину + 0,5 мл вірусу, що вводять, у розведенні 10-5; і т.д.

4) 4,5 мл суспензії панкреатину + 0,5 мл вірусу, що вводять, у розведенні 10-6;

5) 4,5 мл суспензії панкреатину + 0,5 мл вірусу, що вводять, у розведенні 10-7;

6) 4,5 мл суспензії панкреатину + 0,5 мл вірусу, що вводить, у розведенні 10-8.

Всі партії інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі й потім піддавали низькошвидкісному центрифугуванню протягом 15 хв при 4°C і 4000 об/хв (2700×g). Супернатанти після низькошвидкісного центрифугування в кожному випадку переносили в нові центрифужні пробірки й піддавали ще один раз низькошвидкісному центрифугуванню в тих же умовах. При необхідності обсяг супернатантів, отриманих після низькошвидкісного центрифугування, доводили до 5,0 мл за допомогою середовища для культур клітин і для кожного варіанта 5,0 мл супернатантів, отриманих після низькошвидкісного центрифугування, піддавали ультрацентрифугуванню в східчастому градієнті сахарози як описано вище в прикладі 1. Після ультрацентрифугування верхні фракції («нижня фракція 2 EMCV»; розташована вище рівні 1,5 см в ультрацентрифужній пробірці) для кожного варіанта відкачували за допомогою шлангового насоса й відповідні розташовані ще нижче фракції («нижня фракція 3 EMCV») видаляли з ультрацентрифужній пробірки за допомогою піпетки. Обсяг нижніх фракцій, отриманих після ультрацентрифугування, для кожного варіанта доводили до 5,0 мл за допомогою середовища MEM і потім використали для титрування або культивування в колбах для культур тканини.

Після цього на основі кожної із зазначених вище партій 1)-3) наготовлювали серійні розведення вірусу з коефіцієнтом розведення 3 і переносили кожне з 12 розведень в 12 паралельних лунок на титраційні мікропланшети, що містять суспензію клітин лінії SPEV (порції по 100 мкл на лунку свіжоприготовленої клітинної суспензії клітин лінії SPEV у концентрації 200000 клітин/мл). Експериментальні зразки нижньої фракції 3 EMCV для всіх партій додатково переносили в колби для культур тканини із площею підстави 25 см², що містять порції по 10 мл свіжоприготовленої клітинної суспензії клітин лінії SPEV у концентрації 200000 клітин/мл. Для цієї мети по 6 колб для культур тканини для кожного експериментального зразка заражали порцією 0,2 мл нижньої фракції 3 експериментальні зразки EMCV. Паралельно наготовлювали як контроль одну колбу для культур тканини без яких-небудь додавань. Всі титраційні планшети й колби для культур тканини інкубували при 36±1°C і протягом 6-7 днів обстежили за допомогою мікроскопа відносно розвитку CPE у лунках або в колбах для культур тканини. Титр у титрованих експериментальних зразках розраховували відповідно до методу Спирмана - Карбера.

В жодній з 6 колб для культур тканини розглянутої партії по витікання 7 днів не було виявлено CPE, те ці колби тричі піддавали заморожуванню при - 70°C і повторному відтаванню. Уміст всіх колб для культур тканини поєднували й фільтрували через 0,1 мкм - фільтр (розмір пор). Отриманий фільтрат використали для готування другого пасажу суспензії клітин лінії SPEV: 2 колби для культур тканини, кожна з яких містила по 10 мл свіжій суспензії клітин лінії SPEV, заражали 2 мл

суспензії, отриманої після 1-го пасажу, і в такий же спосіб інкубували протягом періоду часу аж до 7 днів при 36±1°C і обстежили відносно розвитку CPE. Якщо й в 2-му пасажі не було виявлено CPE, то додатково здійснювали 3-й пасаж. Якщо в 3-м у пасажі також одержували негативний результат, то можна вважати, що вихідний експериментальний зразок не містить EMCV.

В вищевказаних тестах з низьким рівнем уведеного вірусу з використанням серійних розведень EMCV була оцінена межа виявлення способу, пропонуваного у винаході, що склав одну інфекційну одиницю EMCV на 0,1 г використовуваного зразка панкреатину.

б. Тест із низьким рівнем уведеного PPV

Наготовлювали суспензію PAN (що містить 2,5 г свинячого панкреатину, 2,5 мл розчини антибіотиків, 20 мл середовища Дульбекко). Тест із низьким рівнем уведеного вірусу здійснювали з дублюванням у вигляді незалежних друг від друга тестів:

Для цієї мети наготовлювали зазначені нижче партії, використовуючи суспензію PAN і розчин вірусу, що вводить, PPV:

- 1) 4,5 суспензії панкреатину + 0,5 мл вірусу, що вводить, у розведенні 10-1;
- 2) 4,5 суспензії панкреатину + 0,5 мл вірусу, що вводить, у розведенні 10-2;
- 3) 4,5 суспензії панкреатину + 0,5 мл вірусу, що вводить, у розведенні 10-3;
- 4) 4,5 суспензії панкреатину + 0,5 мл вірусу, що вводить, у розведенні 10-4.

Всі партії інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі й потім піддавали низькошвидкісному центрифугуванню протягом 15 хв при 4°C і 4000 об/хв (2700×g). Супернатанти після низькошвидкісного центрифугування в кожному випадку переносили в нові центрифужні пробірки й піддавали ще один раз низькошвидкісному центрифугуванню в тих же умовах. При необхідності обсяг супернатантів, отриманих після низькошвидкісного центрифугування, доводили до 5,0 мл за допомогою середовища для культур клітин і для кожного варіанта 5,0 мл супернатантів, отриманих після низькошвидкісного центрифугування, піддавали ультрацентрифугуванню в східчастому градієнті сахарози як описано вище в прикладі 1. Після ультрацентрифугування верхні фракції («нижня фракція 2 PPV»; розташована вище рівня 1,5 див в ультрацентрифужній пробірці) для кожного варіанта відкачували за допомогою шлангового насоса й відповідні розташовані ще нижче фракції («нижня фракція 3 PPV») видаляли з ультрацентрифужній пробірки за допомогою піпетки. Обсяг нижніх фракцій, отриманих після ультрацентрифугування, для кожного варіанта доводили до 5,0 мл за допомогою середовища Дульбекко й потім використали для титрування або культивування в колбах для культур тканини.

Після цього на основі кожної із зазначених вище партій 1)-3) наготовлювали серійні розведення вірусу з коефіцієнтом розведення 3 і переносили кожне з 12 розведень в 8 паралельних лунок на титраційні мікропланшети, що містять суспензію клітин лінії SK-6 (порції по 100 мкл на лунку свіжо-

приготовленої клітинної суспензії клітин лінії SPEV у концентрації 200000 клітин/мл).

6 колб для культур тканини для кожного експериментального зразка заражали порцією 0,2 мл нижньої фракції 3 експериментальних зразки PPV. Паралельно наготовлювали як контроль одну колбу для культур тканини без яких-небудь додавань. Всі титраційні планшети й колби для культур тканини інкубували при $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ і протягом 6-7 днів обстежили за допомогою мікроскопа відносно розвитку CPE у лунках або в колбах для культур тканини. Титр у титрованих експериментальних зразках розраховували відповідно до методу Спирмана - Карбера.

Якщо в жодній з 6 колб для культур тканини розглянутої партії по витікання 7 днів не було виявлено CPE, те ці колби тричі піддавали заморожуванню при -70°C і повторному відтаванню. Уміст всіх колб для культур тканини поєднували й фільтрували через 0,1 мкм - фільтр (розмір пор). Отриманий фільтрат використали для готування другого пасажу суспензії клітин лінії SK-6: 2 колби для культур тканини, кожна з яких містила по 10 мл свіжій суспензії клітин лінії SK-6, заражали 2 мл суспензії, отриманої після 1-го пасажу, і в такий же

спосіб інкубували протягом періоду часу аж до 7 днів при $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ і обстежили відносно розвитку CPE. Якщо й в 2-му пасажі не було виявлено CPE, то додатково здійснювали 3-й пасаж. Якщо в 3-му пасажі не було виявлено CPE, то через 7 днів середовище для культур клітин видаляли з колб для 3-го пасажу й шар клітин фіксували за допомогою охолодженої на льоді суміші ацетон/метанол (80:20 об./об.). Потім робили виявлення заражених клітин у колбах для культур тканини з використанням міченого за допомогою ФІТЦ антитіла до PPV (1 мл розчину антитіла на колбу; інкубація протягом 60 хв при 37°C , відмивання буфером для відмивання й наступна оцінка за допомогою мікроскопа в УФ-промінях). Якщо в колбах для 3-го пасажу не виявлено заражених клітин, то можна вважати, що вихідний експериментальний зразок не містить PPV.

В вище вказаних тестах з низьким рівнем уведеного вірусу з використанням серійних розведень PPV була оцінена межа виявлення способу, пропонованого у винаході, що склав одну інфекційну одиницю PPV на 0,1 м використовуваного зразка панкреатину.