



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 56131

(13) C2

(51) 7 A61L2/00, A01N1/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО ЗНЕЗАРАЖЕННЯ ТРОМБОЦИТІВ

1

2

(21) 97105096

(22) 09 04 1996

(24) 15 05 2003

(86) PCT/US96/05018, 09 04 1996

(31) 08/424,895

(32) 19 04 1995

(33) US

(46) 15 05 2003, Бюл. №5, 2003 р.

(72) Ред. Марджорі, US, Боде Артур, US,
Суммарія Луї, US(73) ЗЕ ЮНІВЕРСІТІ ОФ НОРС КАРОЛІНА АТ ЧА-
ПЕЛ ХІЛЛ, US, ІСТ КАРОЛІНА ЮНІВЕРСІТІ, US,
АРМОУР ФАРМАСЬЮТІКАЛ КОМПАНІ, US

(56) WO, A, 84/01894, 24 05 1984

WO, A, 88/09655, 15 12 1984

WO, A, 93/23997, 09 12 1993

US, A, 5 281 392, 25 01 1994

(57) Спосіб інактивації мікробіологічних
забруднювачів у препаратах, виготовлених із
тромбоцитів крові людини, який включає- отримання тромбоцитів крові, які можливо забру-
днені мікроорганізмами,- обробку вищезгаданих тромбоцитів людини фік-
сатором протягом часу, що достатній для їх фікса-
ції,- висушування вищезгаданих тромбоцитів з отри-
манням фіксованих сухих тромбоцитів крові, при-
чому- вищезгадану обробку проводять протягом часу,
що достатній для того, щоб знищити вищезгадані
мікроорганізми і- вищезгадану обробку проводять протягом часу,
що недостатній для того, щоб вищезгадані тром-
боцити втратили такі властивості, як

а) адгезія до тромбогенних поверхонь,

б) відсутність адгезії до нетромбогенних повер-
хонь,в) зміну форми (округлення) під час адгезії до
тромбогенних поверхонь,г) агрегацію та формування гемостатичного згустку
під час контакту з тромбогенними поверхнями,

д) викид вмісту внутрішніх гранул

2 Спосіб за п. 1, де вищезгадані мікроорганізми
обираються з групи, що складається з бактерій та
вірусів3 Спосіб за п. 1, де вищезгадану обробку прово-
дять, змішуючи вищезгадані тромбоцити з розчи-
ном, що містить згаданий фіксатор4 Спосіб за п. 1, де висушування проводять шля-
хом ліофілізації5 Спосіб за п. 1, де згаданий фіксатор обирається
з формальдегду, параформальдегду та глутара-
льдегду

6 Спосіб за п. 1, де фіксатор є перманганатом

7 Спосіб за п. 1, де після фіксації тромбоцити ста-
білізують альбуміном8 Спосіб за п. 1, де після фіксації тромбоцити ста-
білізують трегалозою

Даний винахід відноситься до способу отри-
мання та очищення від мікробних забруднювачів
сухих фіксованих кров'яних пластинок (тромбоци-
тів), придатних для використання у лікуванні лю-
дей

Концентрати тромбоцитів успішно застосову-
ються у переливанні крові вже протягом тридцяти
років. Проте, швидка втрата функціональної акти-
вності під час зберігання та ризик бактеріального
забруднення дуже ускладнює ефективний облік та
зберігання концентратів тромбоцитів у банках кро-
ві. У багатьох випадках обмежені терміни збері-
гання концентратів тромбоцитів значно зменшують

рівень їх використання

Е. Клейн (E. Klein et al., J. Pediatrics 49, 517-
522, (1956)), описав приготування ліофілізованих
препаратів тромбоцитів та їх застосування у ліку-
ванні дітей з гострою лейкемією та апластичною
анемією. При цьому введення супроводжувалося
болем та спазмами судин у місці інфекції. Обме-
жену ефективність застосування таких препаратів
продемонстровано в таблиці 2 згаданої роботи.
Упродовж більше, ніж 30 років застосування, такі
препарати тромбоцитів не показали задовільних
терапевтичних результатів

3 метою зробити використання концентратів

(13) C2

(11) 56131

(19) UA

тромбоцитів у переливанні крові більш зручним для банків крові, виник значний інтерес у розробці засобів для усунення або принаймні зменшення втрати функціональної активності концентратами тромбоцитів під час зберігання. Один підхід полягав у створенні вільного від плазми середовища для зберігання (S. Holme, US Patent №4695460). Інший підхід полягав у розробці біохімічних технологій для стабілізації тромбоцитів (A. Bode et al., US Patent №4994367). Хоча ці підходи забезпечують корисне продовження терміну зберігання, вони не дозволяють збільшити термін зберігання на значний період часу.

Врешті, було описано приготування мікровезикул з тромбоцитарних мембран, виходячи з, серед інших, прострочених препаратів тромбоцитів (F. Chao, US Patent №5185160).

Описано використання висушених фіксованих тромбоцитів у діагностиці (Brinkhous et al., US Patent №4287087). Такі сухі фіксовані препарати тромбоцитів можуть зберігатися протягом значного часу для діагностичних цілей, проте раніше вони не мали форми, придатної для фармацевтичного використання. Таким чином, все ще існує потреба у розробці нових засобів приготування кров'яних тромбоцитів, які мали б довгий термін зберігання та були придатними для використання у лікуванні людей.

Сухі фіксовані тромбоцити та спосіб їх приготування було описано раніше (M. Read et al., PCT Application W093/23997, опубліковано у грудні 1993 р.).

Даний винахід відноситься до способу інактивації мікробіологічних забруднювачів у препаратах тромбоцитів крові людини. Спосіб включає, по-перше, отримання тромбоцитів, зокрема тромбоцитів людини, можливо забруднених мікроорганізмами (бактерії, віруси). Тромбоцити обробляють фіксатором протягом часу, достатнього для фіксації тромбоцитів. Після фіксації тромбоцити переважно промивають та висушують для отримання сухих фіксованих тромбоцитів. Час фіксації тромбоцитів підбирається таким чином, щоб його було досить також для знищення частини або всіх мікроорганізмів, які забруднюють препарат. Однак, час фіксації підбирається також таким чином, щоб він був недостатнім для втрати тромбоцитами після висушування та ресуспендування наступних властивостей:

- 1) адгезія до тромбогенних поверхонь,
- 2) відсутність адгезії до нетромбогенних поверхонь,
- 3) зміна форми (округлення) під час адгезії до тромбогенних поверхонь,
- 4) агрегація та формування гемостатичного згустка під час контакту з тромбогенними поверхнями,
- 5) викид вмісту внутрішніх гранул.

Іншими словами, тромбоцити мають залишатися життєздатними після процедури фіксації.

Ці та інші аспекти даного винаходу детально пояснюються нижче.

Приготування біофармацевтичних препаратів на основі крові потребує усунення або знищення принаймні кількох логарифмічних циклів мікробної інфекційності. У випадку часткового знищення (ба-

ктеріцидні та віроцидні методи) або повного знищення (процеси стерилізації) така інактивація дає гарантію, що кінцевий продукт не містить побічних агентів, включаючи забруднювачі, які можуть надходити з вихідним матеріалом.

Спосіб згідно даного винаходу можна здійснювати з використанням фіксатору, який обирають серед формальдегіду, параформальдегіду та глутарового альдегіду. Фіксація такими сполуками потребує ретельної модифікації способу, описаного у US Patent №4287087, щоб запобігти втраті життєздатності тромбоцитів. В цілому, відмити тромбоцити фіксують шляхом їх інкубації, звичайно при кімнатній температурі, до 60 хвилин (переважно від 30 до 45 хвилин, внаслідок того, що деякі віруси потребують для інактивації всього 30 хвилин) у 1,8% розчині фіксатора (переважно від 1 до 2% фіксатора). Як детальніше обговоритиметься нижче, достатня фіксація також необхідна, щоб запобігти небажаного лізису під час подальшого етапу висушування.

Може бути застосована альтернативна техніка фіксації тромбоцитів шляхом їх інкубації у розчині перманганату, (наприклад, перманганату натрію або перманганату калію). В цілому, згідно вказаної методики, відмиті тромбоцити інкубують у розчині KMnO_4 або NaMnO_4 з концентрацією від 0,01 до 10 г/л протягом 5-20 хвилин, переважно у розчині KMnO_4 або NaMnO_4 з концентрацією від 0,05 до 5 г/л протягом 5-15 хвилин, найкраще у розчині KMnO_4 або NaMnO_4 з концентрацією від 0,05 до 0,5 г/л протягом 8-12 хвилин.

Для приготування фармацевтичних сполук препарати тромбоцитів обов'язково мають бути очищені від сторонньої речовини, зокрема від лізованих тромбоцитів, які можуть бути джерелом вільних тромбогенних факторів при введенні пацієнтові. Таким чином особливу увагу слід приділити достатній фіксації тромбоцитів (без порушення життєздатності за вищевказаними характеристиками) перед висушуванням. В іншому випадку процес висушування може супроводжуватися небажаним лізисом. Наприклад, препарати тромбоцитів, що придатні для приготування фармацевтичних сполук для людини, характеризуються такими показниками: при розведенні до концентрації 10^9 тромбоцитів на 1 мл розчину не більше 10^7 мікрочастинок (фрагментованих залишків лізованих тромбоцитів) на 1 мл та не більше 150 міжнародних одиниць (IU) на лтр лактатдегідрогенази у супернатанті при ресуспендуванні та осадженні (лактатдегідрогеназа у концентрації 2200 IU/л повністю лізує 10^9 клітин у 1 мл).

Висушування тромбоцитів після фіксації може бути проведене одним з придатних способів, але переважно здійснюється шляхом ліофілізації. Слід приділити увагу стабілізації тромбоцитів перед висушуванням, щоб запобігти небажаного лізису. Стабілізація здійснюється, наприклад, шляхом ресуспендування тромбоцитів у розчині, який містить молекули придатного замісника води ("стабілізатора"), такого як альбумін або трегалоза, та подальшого висушування розчину. На практиці застосовують розчин альбуміну у масовій концентрації від 0,1 до 20%, переважно розчин альбуміну у масовій концентрації від 1 до 10%, найкраще

розчин альбуміну у масовій концентрації від 5 до 10%. Для застосування у лікуванні важливе значення має видоспецифічність альбуміну (наприклад, для людини - людський альбумін). В іншому випадку, для стабілізації можна застосовувати альбумін іншого виду з подальшим його вилученням. Перед введенням суб'єкту у препарат додають видоспецифічний альбумін. Щоб запобігти антигенних реакцій у суб'єкта лікування, треба подбати про повне очищення препарату від видоспецифічного альбуміну.

Фармацевтичні препарати згідно даного винаходу можуть складатися просто з сухих (переважно ліофілізованих) тромбоцитів, вільних від пірогенів, стерильних та у стерильній антисептичній упаковці. Препарати можуть також містити альбумін, як було зазначено вище. Фармацевтичні суміші можуть також містити препарат тромбоцитів згідно даного винаходу, ресуспендований у фармацевтичне придатному носії. В ролі такого носія може бути використаний будь-який водний носій, здатний гідратувати тромбоцити таким чином, щоб вони мали вищезгадані характеристики та придатний для внутрішньовенної інекції (наприклад, стерильний, вільний від пірогенів фізіологічний сольовий розчин). Суспендована суміш також може містити інші додаткові агенти, такі як буферні розчини, консерванти та інші фармацевтично активні речовини (див. US Patent №4994367, зміст якого приведено вище).

Для лікування хворих людей фармацевтичні суспензії згідно даного винаходу звичайно застосовують у вигляді внутрішньовенних ін'єкцій. Також лікування потребують пацієнти, які страждають на тромбоцитопенію, геморагічну дисфункцію тромбоцитів, а також важкотравмовані пацієнти, які зазнали великої втрати крові. Доза фармацевтичного препарату буде залежати від ваги та стану пацієнта, та звичайно складатиме від 20 до 350мл за об'ємом у концентрації від 1×10^9 до 3×10^9 тромбоцитів на 1мл (найкраще від 2×10^9 до 3×10^9 тромбоцитів на 1мл). Фармацевтичні препарати можуть бути розфасовані у стерильні, вільні від пірогенів контейнери у дозованих об'ємах.

Даний винахід детальніше описано у наступних прикладах. Ці приклади ілюструють винахід, але ніяким чином не обмежують його.

Приклад 1

Приготування сухих фіксованих тромбоцитів

А. Приготування ліофілізованих тромбоцитів людини (Протокол 1). Тромбоцити отримують, виходячи з суміші крові та розчину кислого цитрату декстрози (ЦД) в ролі антикоагулянту (0,085М цитрат натрію, 0,0702М лимонної кислоти, 0,111М декстрози, pH=4,5) у співвідношенні антикоагулянт-кров 1:5,66. Тромбоцити виділяють шляхом диференційного центрифугування та відмивають кислим цитратним буфером (0,00544М цитрату натрію, 0,154М NaCl, pH доводять до 6,5 за допомогою 0,1N HCl).

Після відмивання тромбоцити фіксують, інкубуючи тромбоцити, які отримано з 100мл крові, у 5,0мл 1,8% розчину параформальдегіду (приготований, виходячи з 9,0мл 4% розчину параформальдегіду, додаючи 1,0мл ЦД та 10мл 0,135М NaH_2PO_4) протягом 45 хвилин при кімнатній тем-

пературі (час фіксації можна збільшити до 60 хвилин). Альтернативний спосіб полягає в інкубації відмитих тромбоцитів, отриманих з 100мл крові в 1% розчині параформальдегіду протягом 45 хвилин при кімнатній температурі (час фіксації можна збільшити до 60 хвилин).

Для усунення параформальдегіду після інкубації у кожному пробірці додають рівну кількість імідазольного сольового буферу (0,084М імідазолу, 0,146М NaCl, pH доводять до 6,8 за допомогою 1,0N HCl). Після цього тромбоцити осаджують центрифугуванням при 1500g протягом 8 хвилин при кімнатній температурі. Супернатант зливають, а осад тромбоцитів промивають, ресуспендуючи його в 5-10мл імідазольного буферу, pH=7,35. Промивання повторюють ще двічі для повного видалення параформальдегіду. Після третього промивання тромбоцити ресуспендують у 5% розчині сироваткового альбуміну (5г альбуміну на 100мл цитратного буферу 0,0054М цитрату натрію, 0,154М NaCl, pH 6,5). Тромбоцити підраховують, використовуючи фазовоконтрастний мікроскоп та гемоцитометр (American Optical Bright-Line Hemocytometer). Концентрацію тромбоцитів доводять до 800000 на мм³.

Аліквоти по 10мл суспензії тромбоцитів заданої концентрації у розчині сироваткового альбуміну вносять у скляні пробірки та заморожують до -70°C. Потім тромбоцити ліофілізують протягом 12 годин до отримання розсипчастого білого порошку.

Препарати тромбоцитів також можуть бути заморожені у більших об'ємах (від 100 до 500мл) та ліофілізовані протягом 4 годин при температурі -40°C, після чого на решту часу висушування температуру підвищують до -25°C. Ліофілізовані продукти зберігають при температурі від -20°C до -70°C до використання.

Ліофілізовані тромбоцити регідратують у 0,084М імідазольному безсолевому буфері, pH якого доводять до 7,35 за допомогою 1,0М NaOH. Після додавання імідазольного буферу суміш залишають на декілька хвилин, потім обережно перемішують, обертаючи пробірки, для отримання гомогенної суспензії регідратованих окремих тромбоцитів.

Б. Приготування ліофілізованих тромбоцитів людини (Протокол 2). Цілісну кров отримують від здорових добровільних донорів у стандартні контейнери для збирання крові (Fenwal 4R6402, Baxter Health Care), які містять стандартну кількість антикоагулянту (CPDA-1). Кінцевий об'єм кожного зразку отриманої крові після змішування з цитратом становить 500см³. Кожен контейнер з цілісною кров'ю центрифугують для отримання збагаченої тромбоцитами плазми, яку вилучають з контейнерів та відмивають, проводячи три цикли центрифугування/ресуспендування у фосфатному буферному розчині (такому, як описано у пункті А). Після цього відмиті тромбоцити осаджують центрифугуванням, та обробляють осад буферним розчином, що містить 1,8% параформальдегіду (описаного у пункті А), протягом 45 хвилин-1 години при кімнатній температурі. Вихід тромбоцитів після вилучення стабілізуючого агенту та подальшого промивання для видалення параформальдегіду складає 60-80% від вихідної кількості,

підрахованої перед стабілізацією. Якщо буферний розчин, яким промивають тромбоцити після стабілізації, не містить альбуміну, відсоток виходу тромбоцитів зменшується.

Склад суспензії тромбоцитів перед заморожуванням та висушуванням є важливим для отримання необхідного кінцевого виходу тромбоцитів. В цілому, для забезпечення виходу 85-100% після процедури ліофілізації та регідратації необхідно, щоб буферний розчин містив ефективну кількість стабілізатору, такого як альбумін або трегалоза. Альбумін вводять у концентрації від 1 до 500 г/л, переважно у концентрації від 10 до 250 г/л, найкраще у концентрації від 50 до 100 г/л. Трегалозу вводять у концентрації від 0,1 до 10 М, переважно у концентрації від 0,2 до 5 М, найкраще у концентрації від 0,5 до 1,0 М. Можна застосувати декілька типів депрідруючих розчинів без помітної різниці кінцевих параметрів фосфатний сольовий буферний розчин, pH=7,3, трис-сольовий буферний розчин, pH=7,4, імідазольний сольовий буферний розчин, або UNISOL™ збалансований фізіологічний сольовий розчин.

Приклад 2

Очищення тромбоцитів від бактерій

Метою цього експерименту було дослідження кінетики інактивації бактерій 1,8% розчином формальдегіду під час процесу консервації тромбоцитів.

Дванадцять контейнерів тромбоцитів були отримані від Американського Червоного Хреста. *Bacillus cereus* були введені в кожний контейнер до отримання колонієутворюючих одиниць (КО) у кінцевій концентрації 50 КО/мл у всіх контейнерах. З вмісту шести контейнерів приготували ліофілізовані препарати тромбоцитів згідно прикладу 1 (протокол 1) та повернули їх у нові контейнери для зберігання тромбоцитів. Шість інших зразків залишилися у вихідних зберігальних контейнерах. Щоденно протягом семи днів у всіх контейнерах кількісно оцінювали рівень росту бактеріальних культур (розсівання 0,1 мл суспензії після серії розведень на чашки з агаром та інкубація протягом 48 годин при температурі 37°C, зразки продубльовано). В результаті спостерігали ріст *Bacillus cereus* на всіх шести зразках, що зберігались за нормальних умов, але не на оброблених тромбоцитах.

У другому експерименті шість контейнерів з тромбоцитами були інокульовані *Staphylococcus epidermis* у кінцевій концентрації 50 КО/мл. Вміст кожного контейнеру розділили на дві рівні частини. Одну частину з кожного контейнеру обробили згідно прикладу 1 (протокол 1) та повернули після цього у нові контейнери для зберігання. Решту зразків зберігали за нормальних умов. В результаті на необроблених зразках усіх контейнерів на третій день спостерігали ріст *S. epidermis*. У попередніх експериментах було показано, що ураження препаратів тромбоцитів, інокульованих *S. epidermis* у кінцевій концентрації 50 КО/мл, спостерігалось у 100% випадків на 7 день (M. Brecher et al., Transfusion 34, 750-755 (1994)). Фіксовані та відмиті згідно прикладу 1 тромбоцити залишилися стерильними протягом всіх 7 днів спостереження.

Приклад 3

Очищення тромбоцитів від вірусів

В цьому експерименті модельні віруси, що репрезентують широкий спектр вірусних характеристик, були випробувані на інактивацію через п'ять різних проміжків часу при інкубації у 1,8% розчині параформальдегіду згідно прикладу 1.

Для дослідів були обрані наступні віруси, які представляють спектр біофізичних та структурних рис, що можуть відображувати характеристики потенційних забруднювачів вихідного матеріалу.

1) Вірус діареї великої рогатої худоби (BVD, штам KY-22)-розмір 40-70 нм, має ліпідну оболонку, РНК-вмісний вірус. Останні дослідження вірусного геному та фізичні характеристики вірусу гепатиту С (HCV, відомий як гепатит н-А н-В) показали, що він належить до родини флавівірусів, роду пестівірусів. Зважаючи на те, що HCV не може бути культивований *in vitro*, та для нього не існує придатних модельних тварин, крім шимпанзе, BVD був використаний як модель HCV в даному експерименті.

2) Вірус енцефаломієкардиту (ЕМС, штам ЕМС)-розмір 28-30 нм, не має ліпідної оболонки, РНК-вмісний пікорнавірус, дуже стійкий до багатьох стандартних методів інактивації вірусів. Цей вірус належить до тієї ж родини, що й вірус гепатиту А та Є, відповідно, непоганою моделлю для нього.

3) Вірус імунодефіциту людини (HIV, штам HTLV-IIIb)-розмір 80-100 нм, має оболонку, РНК-вмісний ретровірус, є потенційним забруднювачем крові людини. HIV було титровано *in vitro* синцитіальним методом СЕМ-А. Через 7-10 днів після інфікування HIV клітини СЕМ-А утворюють багатоядерні клітини (синцитії), які легко спостерігаються. Всі роботи з HIV проведено на спеціалізованому обладнанні BCL-3 (Biotech).

I Методика

A Матеріали

Аліквотні проби стерильного вихідного продукту (тромбоцитів у цитратному сольовому буферному розчині) приготували за описаною вище методикою. Контрольний матеріал зберігали при температурі від 22°C до 28°C. Аліквоти 4% параформальдегіду, 0,135 М буферний розчин фосфату натрію, буферний розчин ЦД та імідазольний сольовий буферний розчин зберігали при кімнатній температурі.

Б Дослідження токсичності

В попередньому дослідженні було перевірено токсичність контрольного матеріалу на індикаторних клітинах BT-1, які використовували для титрування BVD, індикаторних клітинах VERO, які використовували для титрування ЕМС та індикаторних клітинах СЕМ-А, які використовували для титрування HIV-1. Для кожного вірусу було перевірено на цитотоксичність такі дослідні зразки:

1) розчин тромбоцитів перед обробкою параформальдегідом,

2) розчин тромбоцитів після обробки 1,8% розчином параформальдегіду.

На початку аналізу 1,8 мл дослідного зразку I (PV-001) обробили 0,2 мл суспензії вірусу в буфері, потім додали 1,8 мл 4% розчину параформальдегіду. Таким чином створено зразки PV-004, PV-006

та PV-008. Другу аликвотну пробу приготували, обробивши 3,3мл вихідного розчину тромбоцитів (PV-001) 0,7мл суспензії вірусу в буфері. Таким чином створено зразки PV-003, PV-005 та PV-007. Усі зразки перевірено в двох екземплярах на цитотоксичність на відповідних індикаторних клітинах. Перевіряли нерозведені розчини, розведені у 10 разів та розведені у 100 разів (в мінімальному середовищі Ігла (EMEM)) відповідно стандартного протоколу титрування кожного вірусу (див. Розділ 4.60). Якщо внаслідок дії зразку, злиття моношару індикаторних клітин було меншим 50%, то такий зразок вважали цитотоксичним.

За результатами попереднього дослідження токсичності, проби, що містили параформальдегід, показали досить високий ступінь цитотоксичності. Тому взяли додаткові зразки, що містили тромбоцити, оброблені параформальдегідом, але параформальдегід було видалено шляхом центрифугування та промивання. Такі зразки аналізували безпосередньо, без зараження, за методикою, описаною вище. Таким чином створено зразки PV-032, PV-033 та PV-034.

В. Дослідження інактиваційних властивостей

Для кожного з вірусів, що аналізувалися, контроль проведено в таких точках:

- 1) T_0 ,
- 2) $T_{0.5}$ =30 хвилин,
- 3) T_1 =1 година,
- 4) $T_{1.5}$ =1 година 30 хвилин,
- 5) T_2 =2 години.

Вихідний продукт (3,6мл тромбоцитів у цитратному сольовому буферному розчині), температура якого була $25\pm 3^\circ\text{C}$, обробили 0,4мл вірусу з високим титром. Рівень pH зразку довели до 6,8-7,6, та зразок поділили на дві рівні аликвотні проби. Одну з проб одразу ж заморозили до температури -70°C або нижче для того, щоб використати її як дублікат. Паралельно зробили аналіз іншої аликвотної проби, використовуючи відповідну методику вірусного титрування, як описано нижче у розділі Д. Таким чином створено зразок " T_0 ".

21,6мл вихідного продукту (тромбоцити у цитратному сольовому буферному розчині) центрифугували протягом 8 хвилин при 800g та при температурі $25\pm 3^\circ\text{C}$ для осадження тромбоцитів. Приготували свіжий 2% розчин параформальдегіду, змішавши 12,5мл 4% розчину параформальдегіду з 11,5мл 0,135M фосфатного буферного розчину та 1,0мл буферного розчину ЦД. Після того, як видалили цитратний сольовий супернатант, осаджені тромбоцити ресуспендували у 21,6мл свіжого 2% розчину параформальдегіду. Таку тромбоцитарну суспензію обробили 2,4мл вірусу з високим титром, довівши таким чином концентрацію параформальдегіду до 1,8%. Вихідний продукт, що обробили 1,8% розчином параформальдегіду, поділили на чотири аликвоти, три об'ємом по 4мл і одну об'ємом 10л. Після цього зразки інкубували на водяній бані з температурою $25\pm 3^\circ\text{C}$. За змінами температури спостерігали та реєстрували.

Для створення зразків $T_{0.5}$, T_1 та $T_{1.5}$ (± 1 хвилини) взяли аликвоти об'ємом по 4мл. До кожної аликвоти об'ємом 4мл додали 4мл імідазольного сольового буферного розчину. Ці зразки тричі пе-

ремішали, перевертаючи, і центрифугували протягом 8 хвилин при 800g та при температурі $25\pm 3^\circ\text{C}$. Супернатант злили та тромбоцити ресуспендували у 4мл імідазольного сольового буферного розчину. Зразки тричі перемішали, перевертаючи, і центрифугували протягом 8 хвилин при 800g та при температурі $25\pm 3^\circ\text{C}$. Цю процедуру повторили ще двічі. Після останнього центрифугування тромбоцити ресуспендували у 4мл імідазольного сольового буферного розчину. Зразок поділили на дві рівні частини. Одну з частин одразу ж заморозили до температури -70°C або нижче для того, щоб використати її як дублікат. Паралельно зробили аналіз іншої аликвотної проби, використовуючи відповідну методику вірусного титрування, як описано нижче у розділі Д. Для аналізу на BVD та EMC 0,5мл розведених та нерозведених зразків нанесли у кожну з трьох лунок до кінцевого об'єму 1,5мл. Для аналізу на HIV, 0,2мл розведених та нерозведених зразків нанесли у кожну з чотирьох лунок до кінцевого об'єму 0,8мл. Для створення зразку T_2 (± 1 хвилини) вийняли зразок об'ємом 10мл. До кожної аликвоти об'ємом 10мл додали 10мл імідазольного сольового буферного розчину. Ці зразки перемішали, перевертаючи, три рази і центрифугували протягом 8 хвилин при 800g та при температурі $25\pm 3^\circ\text{C}$. Супернатант злили та тромбоцити ресуспендували у 10мл імідазольного сольового буферного розчину. Зразок поділили на дві рівні частини. Одну з частин одразу ж заморозили до температури -70°C або нижче для того, щоб використати її як дублікат. Паралельно зробили аналіз іншої частини, використовуючи відповідну методику вірусного титрування, як описано нижче у розділі Д. Для аналізу на BVD та EMC, 0,5мл нерозведених зразків нанесли у кожну з восьми лунок до кінцевого об'єму 4мл. Для аналізу на HIV, 0,2мл нерозведених зразків нанесли у кожну з двадцяти лунок до кінцевого об'єму 4мл. Усі розведені зразки наносили у лунки, як описано для перших чотирьох часових точок.

Г. Контроль

(1) Позитивний контроль. Як позитивний контроль для кожного вірусу використовували материнський розчин вірусу.

(2) Негативний контроль. Як негативний контроль в кожному аналізі використовували чисте середовище для культивування клітин, яке застосовували при титруванні вірусів.

Д. Титрування вірусів

На початку процедури одну аликвотну пробу від кожного зразку та контролю розвели у середовищі для культивування клітин у таких пропорціях 10^0 , в 3 рази, 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 та 10^8 .

Кожне розведення аналізували на присутність інфекційних вірусних часточок, використовуючи стандартну процедуру вірусного титрування, яка описана нижче для кожного вірусу.

BVD кожне розведення зразків, які містять

BVD, аналізували на присутність інфекційних вірусних часточок за допомогою тесту на стерильні плями з використанням індикаторних клітин BT

EMC кожне розведення зразків, які містять EMC, аналізували на присутність інфекційних вірусних часточок за допомогою тесту на стерильні плями з використанням індикаторних клітин VERO

HIV кожне розведення зразків, які містять HIV, аналізували на присутність інфекційних вірусних часточок за допомогою синцитіального тесту з використанням CEM-A індикаторних клітин

II Результати та пояснення

A Валідність

Тест виявився валідним. Позитивний контроль виявив ознаки інфекційних вірусів, і негативний контроль не виявив вірусів

Б Дослідження токсичності

Результати дослідження токсичності на індикаторних клітинних лініях BT, CEM-A та VERO, що використовувалися для титрування вірусів, подано в Таблиці 1. Вимивання параформальдегіду після обробки ним тромбоцитів, значно знижує токсичність, яка спричинена такою обробкою (PV-032, PV-033 та PV-034). Усі дослідження вірусів проводили, використовуючи таке вимивання

Таблиця 1

Результати дослідження токсичності

Номер зразку	Опис зразку	Лінія індикаторних клітин	Цитотоксичність
PV-003	Розчин тромбоцитів перед обробкою параформальдегідом	BT	Нетоксичний
PV-004	Розчин тромбоцитів після обробки 1,8% розчином параформальдегіду	BT	Токсичний нерозведений, 10^{-1} , 10^{-2}
PV-032	Після вимивання параформальдегіду	BT	Нетоксичний
PV-005	Розчин тромбоцитів перед обробкою параформальдегідом	Vero	Нетоксичний
PV-006	Розчин тромбоцитів після обробки 1,8% розчином параформальдегіду	Vero	Токсичний нерозведений, 10^{-1} , 10^{-2}
PV-033	Після вимивання параформальдегіду	Vero	Нетоксичний
PV-007	Розчин тромбоцитів перед обробкою параформальдегідом	CEM-A	Нетоксичний
PV-008	Розчин тромбоцитів після обробки 1,8% розчином параформальдегіду	CEM-A	Токсичний нерозведений, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}
PV-034	Після вимивання параформальдегіду	CEM-A	Токсичний нерозведений

В Дослідження інактиваційних властивостей

Титри вірусів у кожному зразку та контрольному зразку для дослідження інактиваційних властивостей вказано в таблицях 2-4. Титр вірусів виражено через кількість прямоутворюючих одиниць (ПО) на 1мл або кількість синцитій-формуючих одиниць (СО) на 1мл. Якщо виявлено менше 5ПО(СО) у 1мл або не виявлено зовсім, титри вірусів виражали як $\leq 5,0 \times 10^0$ ПО(СО)/мл. У випадку визначення HIV на клітинах CEM-A використовували трикратне розведення. Якщо виявлено менше 5ПО(СО) у 1мл або не виявлено зовсім, титри вірусів виражали як $\leq 1,5 \times 10^1$ ПО(СО)/мл для трикратно розведених та нерозведених зразків. Значення логарифму зниження титру розраховується шляхом віднімання $\lg[\text{ПО(СО)/мл}]$ кожного зразку від відповідного значення зразку "T₀".

Процес інактивації вірусу розчином параформальдегіду знижував титр вірусу для BVD до значення $\lg=6,93$ (вірус не визначається), для EMC - до значення $\lg=8,78$ (вірус не визначається), для HIV - до значення $\lg=4,77$ (вірус не визначається).

Г Статистичний аналіз

Для визначення змін у титрі вірусів, виявлених після тестування додаткових зразків на додаткових лунках, застосовували статистичний аналіз на основі розподілу Пуассона. Для таких випадків чутливість методу може бути зменшена нижче поточного рівня. У випадках BVD та EMC, якщо вірусу не було виявлено після серії розведень на додаткових лунках, титр виражали як 0,58ПО/мл. У випадку HIV, якщо вірусу не було виявлено після серії розведень на додаткових лунках, титр виражали як 0,29СО/мл.

Таблиця 2

Титри вірусу діареї, великої рогатої худоби (BVD)

Номер зразку	Опис зразку	Титр вірусу, (ПО/мл)	Ig (ПО/мл)	Ig зниження титру
PV-014	Материнський розчин вірусу	$6,5 \times 10^7$	7,81	НВ
PV-009	T_0	$4,9 \times 10^6$	6,69	НВ
PV-010	$T_{0,5}$	$3,3 \times 10^3$	3,52	3,17
PV-011	T_1	$\leq 5,0 \times 10^0$	$\leq 0,70$	$\geq 5,99$
PV-012	$T_{1,5}$	$\leq 5,0 \times 10^0$	$\leq 0,70$	$\geq 5,99$
PV-013	T_2	$\leq 5,8 \times 10^1$	-0,24	6,93

* - титр вірусу не визначається,
ПО - плямоутворюючі одиниці,
НВ - не визначається

Значення Ig зниження титру розраховується відповідного значення зразку " T_0 " (PV-009) шляхом віднімання Ig(ПО/мл) кожного зразку від

Таблиця 3

Титри вірусу енцефаломіокардиту (EMC)

Номер зразку	Опис зразку	Титр вірусу, (ПО/мл)	Ig (ПО/мл)	Ig зниження титру
PV-020	Материнський розчин вірусу	$2,1 \times 10^9$	9,32	НВ
PV-015	T_0	$3,5 \times 10^8$	8,54	НВ
PV-016	$T_{0,5}$	$3,8 \times 10^5$	5,58	2,96
PV-017	T_1	$\leq 5,0 \times 10^0$	$\leq 0,70$	$\geq 7,84$
PV-018	$T_{1,5}$	$\leq 5,0 \times 10^0$	$\leq 0,70$	$\geq 7,84$
PV-019	T_2	$\leq 5,8 \times 10^1$	-0,24	8,78

* - титр вірусу не визначається,
ПО - плямоутворюючі одиниці,
НВ - не визначається

Значення Ig зниження титру розраховується відповідного значення зразку " T_0 " (PV-015) шляхом віднімання Ig(ПО/мл) кожного зразку від

Таблиця 4

Титр вірусу імунодефіциту людини

Номер зразку	Опис зразку	Титр вірусу, (СО/мл)	Ig (СО/мл)	Ig зниження титру
PV-026	Материнський розчин вірусу	$5,6 \times 10^5$	5,75	НВ
PV-021	T_0	$1,7 \times 10^4$	4,23	НВ
PV-022	$T_{0,5}$	$\leq 1,5 \times 10^1$	$\leq 1,18$	$\geq 3,05$
PV-023	T_1	$\leq 1,5 \times 10^1$	$\leq 1,18$	$\geq 3,05$
PV-024	$T_{1,5}$	$\leq 1,5 \times 10^1$	$\leq 1,18$	$\geq 3,05$
PV-025	T_2	$\leq 2,9 \times 10^1$	-0,54	4,77

* - титр вірусу не визначається,
СО - синцитій-формуючі одиниці,
НВ - не визначається

Значення Ig зниження титру розраховується шляхом віднімання Ig(СО/мл) кожного зразку від відповідного значення зразку " T_0 " (PV-021)

Висшезгадані приклади ілюструють даний ви-
нахід, але не обмежують його

