

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГРИППА**

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ГУ НИИ гриппа РАМН,

академик РАМН, профессор

_____ О.И. Киселев

" ____ " _____ 2007 г

**ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
" АПРОБАЦИЯ ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ВИРУС-ИНАКТИВАЦИИ ПЛАЗМЫ
ДОНОРСКОЙ КРОВИ "THERAFLEX-MB PLASMA"
(без участия пациентов)**

Заместитель директора по научной
работе, руководитель темы, д.м.н.

Л.М. Цыбалова

Ответственный исполнитель темы,
вед. научн. сотр. к.м.н.:

А.И. Мигунов

Санкт-Петербург 2007 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

РЕФЕРАТ	3
СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ	4
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
I ВВЕДЕНИЕ	6
II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	8
III РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	19
IV ЗАКЛЮЧЕНИЕ	22
V СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	24
VI ПРИЛОЖЕНИЕ	25

РЕФЕРАТ

Отчет: 41 страница, 1 рисунок, 27 таблиц, 12 источников

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ, ДОНОРСКАЯ ПЛАЗМА, ТЕСТ - ШТАММЫ ВИРУСОВ

Название научно-исследовательской работы: «Апробация оборудования для вирус-инактивации плазмы донорской крови "Theraflex-mb plasma" (без участия пациентов).

Цель исследования состояла в экспериментальной оценке эффективности системы фотодинамической инактивации вирусов "Theraflex-MB Plasma" в свежемороженой плазме донорской крови на модели тест-штаммов различных релевантных и модельных вирусов. Для инфицирования плазмы были использованы РНК- и ДНК-вирусы с различными физико-химическими свойствами, способные контаминировать донорскую плазму:

- модельные — вирус гепатита уток (для вируса гепатита В), вирус диареи телят (для вируса гепатита С), вирус инфекционного бронхита кур (для коронавируса человека);
- релевантные — вирус гриппа, вирус парагриппа 1-го типа, аденовирус 5-го типа, вирус герпеса человека 1-го типа, цитомегаловирус человека.

Каждый вирус был испытан на четырех образцах плазмы.

Показана высокая эффективность сочетанного воздействия света видимой части спектра (590 нм) и метиленовой сини, являющихся действующим началом системы "Theraflex-mb plasma" для инактивации вирусов в плазме крови. Однократная обработка плазмы при режиме освещения 180 Дж/см^2 снижала более, чем на $4 \log_{10}/\text{мл}$ инфекционную активность тест-штаммов вирусов. Такая степень инактивации позволяет практически исключить риск передачи реципиентам вирусов – возбудителей гемотрансмиссивных заболеваний при переливании обработанной плазмы.

Результаты апробации системы "Theraflex-mb plasma" дают основание рекомендовать ее для повышения безопасности донорской плазмы.

Настоящая научно-исследовательская работа выполнена в рамках договора с ЗАО «НПО АСТА», № 001-2007.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

вед. научн. сотр., к.м.н

ст. научн. сотр.

ст. научн. сотр.

научн. сотр.

научн. сотр

научн. сотр.

мл. научн. сотр.

мл. научн. сотр.

Гаврилов А.А.

Слита А.В.

Коновалова Н.И.

Репко И.А.

Ягловская И.Б.

Шалджян А. А.

Коротков А.В.

Пинегина О. Н.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

№ п/п	Сокращение	Расшифровка
1	ВГНКИ	Всероссийский государственный научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов
2	ВНИИВП	Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарного птицеводства
3	ВИЧ	Вирус иммунодефицита человека
4	ФЛЭЧ	Диплоидная культура клеток эмбриона легких человека
5	МА-104	Культура клеток почек обезьяны макака-резус
6	Vero	Культура клеток почки зеленой мартышки
7	РТГА	Реакция торможения гемагглютинации
8	ТЦПД / ₅₀	Титр вируса, выраженный в тканевых цитопатических дозах
9	ЭИД/ ₅₀	Титр вируса, выраженный в эмбриональных инфекционных дозах
10	ЭЛД/ ₅₀	Титр вируса, выраженный в эмбриональных летальных дозах
11	МТТ	3-[4,5-диметил-2-тиазолил]-2,5-дифенилтетразолий бромид

I ВВЕДЕНИЕ

Для биологических медицинских препаратов, получаемых из крови или плазмы человека, исходным материалом являются клетки и жидкая часть крови - плазма. Лекарственные средства, получаемые из крови или плазмы человека, обладают рядом особенностей, связанных с природой исходного материала. Например, исходный материал может содержать биологические агенты, прежде всего вирусы (ВИЧ, вирусы гепатита В и С и др.), являющиеся возбудителями гемотрансмиссивных заболеваний. Безопасность лекарственных средств зависит как от проверки исходного материала и его источника, так и от последующих производственных операций, в т.ч. от удаления и инактивации вирусов (1).

В настоящее время существует несколько методов для инактивации потенциальных вирусов в плазме крови. В России для этого используется карантинизация свежезамороженной плазмы в течение 6 месяцев (2). Этот метод требует не только закупки большого количества морозильных камер, вспомогательной электрической подстанции, но и наличия площадей для их размещения на всех станциях переливания крови. При этом резко увеличиваются затраты на электроэнергию, ведение документации и уничтожение свежезамороженной плазмы, не прошедшей карантин.

В последнее время широкое внедрение получил метод вирус-инактивации плазмы фотодинамическим методом с применением метиленовой сини. Этот метод разработан французской фирмой «МакоФарма». Он основан на комбинированном воздействии видимой части спектра (590нм) на плазму, в которой предварительно растворен фенотиазиновый краситель — метиленовый синий, связывающийся с молекулами ДНК и РНК (пара гуанинцитозин). Поглощая световую энергию, краситель образует активные формы кислорода, денатурирующие нуклеиновые кислоты вирусов. Это приводит к быстрому разрушению нуклеиновых кислот гемотрансмиссивных вирусов и потере их способности к репликации.

По данным испытаний, проведенных в разных европейских странах, применение системы вирус-инактивации «Терафлекс» позволяет 100% плазмы передавать для использования в лечебную сеть. При этом в ней элиминируются не только вирусы гепатитов В и С, ВИЧ-инфекции, но и других видов вирусов, включая грипп, герпес, парвовирус, цитомегаловирус, не тестируемые в крови доноров, а также многие виды бактериальных инфекций, возбудителей трансмиссивных заболеваний (3).

Система для вирус-инактивации компонентов донорской крови “Theraflex MB-Plasma” более 4 лет с успехом применяется во многих странах западной Европы, а также в Малайзии и Бразилии. В Бельгии данная методика применяется в 100% случаев обработки

плазмы, в других странах она используется в сочетании с другими методами при промышленной переработке плазмы. На сегодняшний день данная методика является уникальной и не имеет аналогов в мире. Как показали исследования, свежемороженая плазма, обработанная метиленовой синью, абсолютно безопасна при переливании больным, поскольку дополнительно проходит стадию лейкофльтрации, а метиленовая синь удаляется после фотодинамической процедуры.

За 4 года накоплен опыт проведения более чем трех миллионов процедур по инактивации вирусов фотодинамическим методом с применением метиленовой сини. При этом не было замечено возникновения каких-либо неблагоприятных побочных реакций у больных при трансфузиях плазмы. Следует отметить, что фотодинамическая вирус-инаktivация плазмы в странах Европы является обязательной процедурой перед переливанием детям, роженицам, больным с иммунными нарушениями, пациентам после трансплантации органов и тканей, а также с плановыми хирургическими операциями, требующими трансфузий больших объемов плазмы.

Для получения разрешения к применению этой системы для вирусинаktivации плазмы на территории России по нашему законодательству требуется дополнительная апробация оборудования в ведущих Российских специализированных учреждениях. Целью настоящей НИР явилось проведение экспериментальной оценки эффективности системы фотодинамической инаktivации вирусов “Theraflex-MB Plasma” в свежемороженой плазме донорской крови на модели тест-штаммов различных релевантных и модельных вирусов. Работа выполнена в соответствии с требованиями нормативно-технической документации, действующей, как на территории Российской Федерации, так и в ведущих Европейских странах (4 - 8).

Для отбора тест-штаммов вирусов в данном исследовании были использованы следующие критерии (7):

- различный вирусный геном – ДНК или РНК;
- наличие или отсутствие липидной оболочки;
- вероятность присутствия вирусов в донорской плазме;
- способность к накоплению в культуре клеток и куриных эмбрионах до высоких титров и пригодность к исследованию.

Настоящее исследование проведено в рамках договора с ЗАО «НПО АСТА», № 001-2007.

II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы. Характеристика использованных в экспериментах тест-штаммов вирусов приведена в таблице 1.

Куриные и утиные эмбрионы. Для накопления и титрования вирусов гриппа, парагриппа 1-го типа, инфекционного бронхита кур были использованы 10-11 дневные куриные эмбрионы. Для накопления вируса гепатита уток были использованы 12-13-дневные утиные эмбрионы. Куриные эмбрионы получены из АОЗТ «Синявинская птицефабрика». Утиные эмбрионы получены из ВНИИВП.

Клеточные культуры. В работе были использованы следующие культуры клеток, полученные из коллекции клеточных культур ГУ НИИ гриппа РАМН:

- перевиваемая культура клеток почки зеленой мартышки – Vero;
- перевиваемая культура клеток почек обезьяны макака-резус МА-104;
- диплоидная культура фибробластов легких эмбриона человека (ФЛЭЧ).

Клетки выращивали во флаконах для клеточных культур (Nunc, Дания) в среде Игла MEM с добавлением 10% сыворотки плода коровы и 50 мкг/мл антибиотика цефобид.

Накопление и титрование инфекционной активности вирусов.

Для титрования инфекционной активности тест-штаммов вирусов гриппа, парагриппа 1-го типа, вируса инфекционного бронхита кур и гепатита уток использовали 10-11 дневные куриные эмбрионы. Для титрования тест-штаммов вирусов диареи телят, аденовируса 5-го типа, вируса герпеса 1-го типа и цитомегаловируса человека применяли соответствующую культуру клеток, используемую для накопления этих вирусов.

- Накопление и титрование тест-вирусов на куриных эмбрионах

Тест штаммы вируса гриппа, парагриппа 1-го типа и вируса инфекционного бронхита кур предварительно накапливали путем заражения в аллантоисную полость 10-11 дневных куриных эмбрионов. В образцы плазмы вводили эти вирусы в виде вируссодержащей аллантоисной жидкости. Вирус гепатита уток предварительно пассировали в 12-13 дневных утиных (1 пассаж) и 10-11 дневных куриных эмбрионах (2 пассажа). Ввиду того, что этот вирус накапливается в тушках эмбрионов (максимальное его количество отмечается в печени), после заражения тушки утиных и куриных эмбрионов извлекали в стерильных условиях, гомогенизировали. Для разрушения клеток и большего выхода вируса, гомогенат однократно замораживали-оттаивали, центрифугировали (10 000 об./мин., 30 мин., 4° С).

Характеристика тест - штаммов вирусов, использованных в работе

Название тест-вируса	Вирус гриппа человека	Вирус парагриппа 1 типа	Вирус инфекционного бронхита кур	Вирус диареи телят
Штамм, его характеристика	Штамм: А/Виктория/35/72 (H3N2) Семейство: Orthomyxoviridae, Геном: 8 фрагментов (-) ssRNA, Имеет липидную оболочку Размер вириона: диаметр 100-120 нм	Штамм: Сендай Семейство: Paramyxoviridae, Геном: одноцепочечная РНК Вирион полиморфной формы, либо в виде неправильных сфер диаметром 120-300 нм или длинных нитей, имеет липопротеидную оболочку.	Вакцинный штамм: ИБК Н-120. Семейство: Coronaviridae, Геном: однонитчатая РНК. Вирион имеет сферическую форму, липопротеиновую оболочку, диаметр вириона - 80-160 нм В настоящем исследовании использован в качестве модельного для коронавируса человека	Вакцинный штамм «РП-82». Семейство Reoviridae Геном: фрагментированная двухцепочечная РНК Вирион: имеет сферическую форму, диаметр 70 нм, отсутствует липопротеидная оболочка. В настоящем исследовании использован в качестве модельного для вируса гепатита С человека
Откуда получен	Музей ГУ НИИ гриппа	Музей ГУ НИИ гриппа	Музей ГУ НИИ гриппа	Музей вирусов ВГНКИ
Метод титрования	Определение ЭИД ₅₀	Определение ЭИД ₅₀	Определение ЭИД ₅₀	Определение ТЦПД/50
Накопление вируса	10 - 11 дневные куриные эмбрионы	10 - 11 дневные куриные эмбрионы	10 - 11 дневные куриные эмбрионы	Перевиваемая культура клеток почек обезьяны МА-104, получена из музея клеточных культур ГУ НИИ гриппа РАМН
Титрование вируса (определение инфекционной активности)	10 -11 дневные куриные эмбрионы	10 -11 дневные куриные эмбрионы	10 -11 дневные куриные эмбрионы	Культура клеток МА-104

Характеристика тест - штаммов вирусов, использованных в работе

Название тест-вируса	Вирус гепатита уток	Аденовирус человека 5-го типа	Вирус простого герпеса 1-го типа	Цитомегаловирус человека
Штамм, его характеристика	Вакцинный штамм "ВГНКИ-К" Семейство: <i>Hepadnaviridae</i> Геном: двухцепочечная ДНК Вирион: сферические частицы диаметром 42 нм, имеет липопротеидную оболочку В настоящем исследовании использован в качестве модельного для вируса гепатита В человека	Семейство: <i>Adenoviridae</i> Геном: двухцепочечная линейная ДНК (ММ $\approx 25 \cdot 10^6$ D) Вирус не имеет липопротеиновой оболочки, диаметр капсида ≈ 80 нм	Штамм: ЕС Семейство: <i>Herpesviridae</i> Подсемейство: альфа Геном: двухцепочечная линейная ДНК, (ММ $\approx 100 \cdot 10^6$ D) Вирусные частицы имеют липопротеидную оболочку, диаметр капсида 100 нм	Штамм: AD169 Семейство: <i>Herpesviridae</i> Подсемейство: бета. Геном: двухцепочечная линейная ДНК, (ММ $\approx 150 \cdot 10^6$ D) Вирусные частицы имеют липопротеидную оболочку, диаметр капсида 100 нм
Откуда получен	Музей ФГУ «ВГНКИ»	Американская коллекция тканевых культур, (АТСС)	Коллекция вирусов НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского	Американская коллекция тканевых культур, (АТСС)
Метод титрования	Определение ЭЛД ₅₀	Определение ТЦПД ₅₀	Определение ТЦПД ₅₀	Определение ТЦПД ₅₀
Накопление вируса	12-13 дневные утиные (1 пассаж) и 10-12 дневные куриные эмбрионы (2 пассажа)	Культура клеток почки зеленой мартышки Vero	Культура клеток Vero	Культура клеток ФЛЭЧ
Титрование вируса (определение инфекционной активности)	10 - 12 дневные куриные эмбрионы	Культура клеток Vero	Культура клеток Vero	Культура клеток ФЛЭЧ

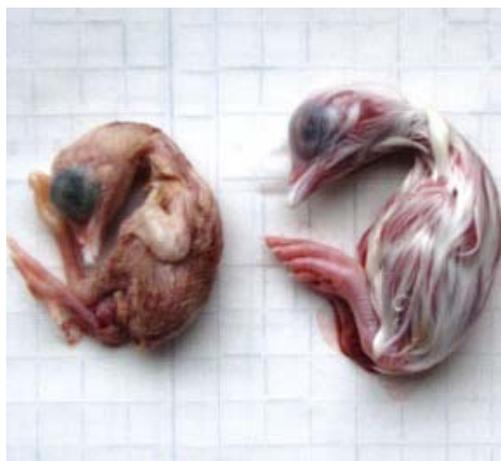
Вирусодержащую надосадочную жидкость декантировали и использовали для введения в образцы плазмы. Инфекционный титр всех тест-штаммов вирусов определяли в инфицированных образцах плазмы как до, так и после обработки.

Для титрования всех вирусов образцы вирусодержащей плазмы предварительно разводили в физиологическом растворе хлористого натрия с коэффициентом 10. Куриные эмбрионы заражали образцами вирусодержащей плазмы до и после обработки, используя по 4 эмбриона на разведение. Заражение проводили в аллантоисную полость 10-11 дневных куриных эмбрионов по 0,2 мл (образцы после обработки дополнительно по 0,5 мл) вирусодержащего материала.

Для титрования вирусов гриппа А/Виктория/35/72 (H3N2) и парагриппа 1-го типа эмбрионы инкубировали при 34 °С в течение 48 часов. По истечении срока инкубации куриные эмбрионы охлаждали при температуре 4 °С в течение 12-18 часов, после чего производили отбор аллантоисной жидкости. Наличие вируса регистрировали по стандартной методике в реакции гемагглютинации с 1% эритроцитами кур (9).

Для титрования вируса инфекционного бронхита кур зараженные по описанной выше методике, куриные эмбрионы инкубировали при 37 °С в течение 7 суток. По истечении срока инкубации эмбрионы охлаждали при температуре 4 °С в течение 12-18 часов, извлекали из скорлупы и исследовали на наличие макроскопических изменений. Характерными признаками инфекционного поражения куриных эмбрионов для этого вируса (10) являются:

- 1.1. Значительное отставание роста эмбрионов (карликовость) по сравнению с контрольной группой, снижение массы тела эмбриона более, чем на 50% по сравнению с контрольной группой;
- 1.2. Перекручивание шеи и прилипание лапок к голове;
- 1.3. Свернувшиеся в клубок инфицированные зародыши имеют округлую форму, уплотненную консистенцию, амниотическая оболочка утолщена, оболочка утолщена, имеются фиброзные налеты (рис.1).



1

2

Рис. 1 Внешний вид куриных эмбрионов, зараженных вирусом инфекционного бронхита кур (штамм ИБК Н-120)

1. Инфицированный куриный эмбрион 2. Неинфицированный эмбрион

Куриные эмбрионы, имеющие такие признаки поражения отмечали знаком «+», остальные — знаком «-». Титр описанных выше вирусов определяли в эмбриональных инфекционных дозах (ЭИД₅₀).

Для титрования инфекционной активности вируса гепатита уток зараженные куриные эмбрионы инкубировали при 37° С в течение 8 суток. Наличие вируса регистрировали по гибели эмбрионов и характерным макроскопическим изменениям в печени (желто-зеленый цвет, отек, множественные кровоизлияния, некрозы) (10). Титр вируса определяли в эмбриональных летальных дозах (ЭЛД₅₀).

- Накопление и титрование инфекционной активности тест-вирусов в культуре клеток

Для накопления аденовируса человека 5-го типа и вируса герпеса 1-го типа выращивали в перевиваемой культуре клеток почки зеленой мартышки — Vero, цитомегаловирус человека — в культуре клеток легких эмбриона человека (ФЛЭЧ), вирус диареи телят — в перевиваемой культуре клеток почек обезьяны макака-резус МА-104. Культивирование и заражение клеток проводили во флаконах для клеточных культур (Nunc, Дания) до проявления 100% цитопатогенного действия. Вирус выращивали в поддерживающей среде Игла МЕМ с добавлением 0,5 % сыворотки плода коровы и 50 мкг/мл антибиотика цефобид. Далее инфицированные клетки разрушали 3-кратным замораживанием-оттаиванием, осаждали с помощью низкоскоростного центрифугирования (3000 об./мин., 20 мин, 4°С). Надосадочную жидкость собирали, фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и использовали для введения в образцы плазмы.

Для титрования всех культуральных вирусов использовали монослойную культуру чувствительных клеток, указанных выше, выращенную в поддерживающей среде Игла MEM при 37°С, в присутствии 5% CO₂ в 96-луночных планшетах (Nunc, Дания). Предварительно были приготовлены 10-кратные разведения плазмы на питательной среде Игла MEM. Из каждого разведения вируса по 100 мкл (образцы плазмы после обработки дополнительно по 200 мкл) было добавлено в 8 лунок. Инфицированные клетки инкубировали в течение трех (вирус герпеса 1-го типа), пяти (аденовирус) и десяти (цитомегаловирус) суток. Оценку наличия вируса проводили по характерным вирусиндуцированным изменениям клеточной морфологии. Титр вируса определяли в тканевых цитопатических дозах (ТЦПД /₅₀).

Донорская плазма.

В экспериментах использовали свежезамороженную плазму, полученную от доноров методом автоматического афереза в период с декабря 2006г по февраль 2007г. из Санкт-Петербургской Городской станции переливания крови. Срок годности свежезамороженной плазмы: 12 месяцев с условием хранения при температуре минус 25-30°С и 1 месяц при температуре минус 18-20°С. Плазму помещали в морозильную камеру на минус 20°С. Всего было использовано 32 пакета плазмы (по 4 пакета на испытание одного тест-штамма вируса). Каждый пакет содержал по 300 мл плазмы, проверенной на ВИЧ-1, ВИЧ-2, HBsAg, антитела к вирусу гепатита С, сифилис. Поскольку плазма представляет собой биологический материал, полученный от человека, который потенциально инфицирован патогенными микроорганизмами, работу с этим материалом проводили в ламинарном боксе с соблюдением правил асептики. Каждый пакет плазмы имел индивидуальный производственный регистрационный номер, которому в ходе проведения испытаний присваивали индивидуальный код (таблица 2).

Таблица 2

Основные параметры пакетов свежемороженой плазмы

Название тест штамма вируса	Регистрационный номер плазмы	Код пакетов плазмы
Вирус гриппа	АП-7841	01_01
	АП-7841	01_02
	АП-7215	01_03
	АП-1234	01_04
Вирус инфекционного бронхита кур	АП-7196	02_01
	АП-7053	02_02
	АП-7053	02_03
	АП-1223	02_04
Вирус парагриппа 1-го типа	АП-7335	03_01
	АП-7284	03_02
	АП-7335	03_03
	АП-7284	03_04
Аденовирус 5-го типа	АП-7833	04_01
	АП-7334	04_02
	АП-7833	04_03
	АП-7334	04_04
Вирус простого герпеса 1-го типа	АП-7249	05_01
	АП-7321	05_02
	АП-7321	05_03
	АП-7321	05_04
Цитомегаловирус	АП-7838	06_01
	АП-7089	06_02
	АП-7089	06_03
	АП-7838	06_04
Вирус гепатита уток	АП-7215	07_01
	АП-7184	07_02
	АП-7184	07_03
	АП-7215	07_04
Вирус диареи телят	АП-1223	08_01
	АП-7294	08_02
	АП-7215	08_03
	АП-7294	08_04

Тестирования плазмы на токсичность, интерференцию и вирусингибирующую активность

Тестировали каждый пакет плазмы от индивидуального донора после оттаивания, до обработки метиленовой синью и светом и введения вируса.

- Тестирование плазмы на куриных эмбрионах

Для изучения *эмбриотоксичности*, плазму вводили в аллантоисную полость куриных эмбрионов в объеме 0,2 мл без разведения (цельную), в разведении 1:2, 1:5 и 1:10

(по 4 эмбриона на разведение). Зараженные эмбрионы помещали в термостат при температуре 37°С и выдерживали в течение сроков, которые необходимы для инкубации эмбрионов при титровании инфекционной активности тест-штамма вируса.

Для вируса гриппа и парагриппа 1-го типа этот срок составлял 72 ч. После этого каждый эмбрион просматривали на овоскопе. Оценку эмбрионотоксичности проводили в сравнении с контрольной группой куриных эмбрионов по следующим параметрам: подвижность эмбриона, состояние кровеносных сосудов и гибель эмбрионов.

Для вируса инфекционного бронхита кур через 7 дней (для вируса гепатита уток через 8 дней) инкубации в термостате при температуре 37°С куриные эмбрионы охлаждали при температуре 4-6°С в течение 12-18 часов, извлекали из скорлупы и исследовали на наличие макроскопических изменений. Оценку эмбрионотоксичности проводили в сравнении с контрольной группой эмбрионов, которым аналогичным образом вводили физиологический раствор хлористого натрия. Оценку проводили по следующим параметрам: отставание в росте и массе, гибель эмбрионов. При наличии у куриного эмбриона даже одного из этих признаков, отмечали знаком «+» и оценивали, как эмбрионотоксическое действие плазмы.

Учитывая, тот факт, что человеческая плазма может содержать вирусспецифические антитела и ингибиторы вируса гриппа и парагриппа 1-го типа, каждый образец нативной плазмы после оттаивания дополнительно исследовали на вирусингибирующее действие для этих вирусов.

Для изучения *вирусингибирующей активности* плазмы, испытуемые тест-штаммы вирусов гриппа и парагриппа предварительно вводили в плазму, разведенную физраствором хлористого натрия от 1:2,1:5 и 1:10. После этого проводили заражение куриных эмбрионов в аллантоисную полость 10 ЭИД₅₀ каждого штамма вируса в объеме 0,2 мл (по 4 эмбриона на разведение). В качестве контроля использовали ту же дозу вируса, разведенного на физрастворе хлористого натрия. Через 72 ч инкубации куриных эмбрионов при температуре 37°С, отбирали аллантоисную жидкость из каждого эмбриона с дальнейшим определением среднего геометрического показателя гемагглютинирующей активности в РГА с 1% раствором куриных эритроцитов. То конечное разведение плазмы, в котором гемагглютинирующая активность вирусов гриппа и парагриппа не отличалась от контроля, учитывали при титровании инфекционной активности этих вирусов в образцах плазмы после обработки. Кроме того, в образцах нативной плазмы определяли суммарный титр вирусспецифических антител, термостабильных и термолабильных ингибиторов в РТГА по стандартной методике (9).

Для изучения потенциальной интерференции компонентов плазмы и репродукции вирусов, в испытуемых образцах плазмы до обработки определяли инфекционный титр

тест-штаммов вирусов в присутствии:

- физиологического раствора хлористого натрия (контроль);
- разведения испытуемого образца плазмы, не обладающей вирусингибирующим и эмбрионотоксическим действием.

• Тестирование действия плазмы на токсичность и интерференцию на клеточных культурах

Тестирование действия плазмы на токсичность и интерференцию на клеточных культурах

Потенциальный *цитотоксический эффект* исследуемого образца плазмы с метиленовым синим определяли качественно – путем микроскопического наблюдения индикаторных клеток Vero, ФЛЭЧ и МА-104 и количественно – с применением колориметрического МТТ-теста. Этот метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ жизнеспособных и пролиферирующих клеток преобразовывать желтую соль метилтетразолия (МТТ) в формазан, имеющий фиолетовую окраску (11). Количество формазана определяли фотометрически, измеряя оптическую плотность растворов при длине волны 550/690 нм.

Индикаторные клетки выращивали в 96-луночных планшетах в питательной среде Игла MEM с добавлением 10 % сыворотки плода коровы и 50 мкг/мл антибиотика цефобид, при 37°С в атмосфере 5 % CO₂; объем среды в лунке составлял 100 мкл. Готовили 8 двукратных разведений тестируемого образца плазмы в питательной среде от 1:10 до 1:1280 и каждое разведение вносили в 10 лунок планшета с культурой клеток по 100 мкл в лунку, в 16 лунок добавляли питательную среду – они служили положительным контролем. Клетки продолжали культивировать в нормальных условиях. Микроскопические наблюдения проводили каждый день. После 5-ти дней культивирования удаляли питательную среду, клетки дважды отмывали 0,15М NaCl, в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора метилтетразолия 1 мг/мл и инкубировали планшеты 3 часа в нормальных условиях. По окончании инкубации раствор метилтетразолия удаляли, а образовавшийся формазан растворяли 96 % изопропанолом в 1N растворе HCl (объем/объем) 100 мкл/лунка. Величину абсорбции растворов измеряли при 550/690 нм на сканирующем спектрофотометре.

Количество живых клеток (в % по отношению к контролю) рассчитывали для каждой лунки следующим образом:

$$\frac{\text{Величина абсорбции раствора в опытной лунке} \cdot 100}{\text{Средняя величина абсорбции в контрольных лунках}}$$

Потенциальную интерференцию действия исследуемого образца плазмы с цитопатогенным действием вируса определяли титрованием исходного вируса в чистой питательной среде и в присутствии исследуемого образца плазмы в нетоксической концентра-

ции.

Схема проведения эксперимента

1. Оттаивание свежемороженого пакета нативной плазмы донорской крови в водяной бане при температуре не выше 32° С.
2. Отбор образца плазмы, после оттаивания в объеме 2 мл для определения ее эмбрионотоксического, вирусингибирующего и цитотоксического действия.
3. Внесение вирусосодержащей жидкости через стерильный шприц в пакет с плазмой после оттаивания в объеме от 5 до 30 мл, перемешивание плазмы крови для равномерного распределения вируса по всему объему; отбор пробы (2 мл) для определения исходного инфекционного титра тест-вируса. Герметичное соединение пакета плазмы с системой пакетов для сбора, хранения и фотообработки компонентов крови “Theraflex-MB Plasma” (Франция, серия 325206E31) при помощи аппарата для стерильного соединения магистралей TSCD (TERUMO Europe N.V., Япония, серийный номер ME*9C201AH). Фильтрация плазмы через фильтр PlasmaFlex и место расположения таблетки метиленового синего в пакет для обработки плазмы. Для каждого тест-вируса использовано 4 образца плазмы крови. Удаление оставшегося воздуха из пакета для обработки плазмы.
4. Загрузка системы пакетов “Theraflex-MB Plasma” в аппарат “Macotronic V4” (MacoPharma, Франция, серийный номер 0513434). Одновременное облучение четырех вирусосодержащих пакетов с плазмой до получения дозы 180 Дж/см³.
5. Переливание обработанной плазмы через фильтр BlueFlex в пакет для хранения плазмы. Отбор пробы (2 мл) для определения инфекционного титра тест-вируса после обработки и удаления метиленовой сини. Все образцы проб, взятых из вирусосодержащей плазмы крови (4 образца до и 4 после обработки) переносили в пенициллиновые флаконы, закрывали резиновой пробкой и хранили до определения инфекционной активности в специальных штативах при температуре 4-6° С.
6. Определение эмбрионотоксического, вирусингибирующего и цитотоксического действия образцов плазмы. Одновременное титрование вируса *ex tempore* на определение инфекционной активности на куриных эмбрионах (для вирусов, титруемых на куриных эмбрионах) или на культуре клеток (для вирусов, титруемых в культуре клеток).
7. Инактивация оставшихся после титрования образцов плазмы, отработанных куриных эмбрионов и культуральных сред и инфицированных клеточных культур и их утилизация как отходов.

Отбор образцов плазмы до и после обработки проводили в ламинарном боксе MSC.12 STD 2 Eloc. (Япония). Отработанную плазму, перчатки, шприцы и другой расходный материал, который имел контакт с плазмой, складывали в бикс и обеззараживали путем автоклавирования (120° С, 1,5 ч.).

Статистическая обработка полученных результатов

1. Расчет инфекционного титра тест-вируса:

1.1. Титр вируса, вызывающий положительный результат в 50% инфицированных куриных эмбрионах или клетках, был рассчитан в соответствии с методом Спирмана и Кербера (8):

$$(\text{ЭИД}/_{50}, \text{ЭЛД}/_{50}, \text{ТЦПД}/_{50}) = 10Y_0 - d/2 + d/n * EY_1$$

Y_0 : положительный показатель степени (экспонент) наивысшего разведения образца с положительными результатами во всех параллельных культурах

d : логарифм шага разведения;

n : число определений;

EY_1 : общее число всех положительных образцов включительно по Y_0 .

1.2. Титр вируса для образцов, в которых ЭИД, ЭЛД и ТЦПД/ $_{50}$ /мл равен нулю, определяли с помощью распределения Пуассона при $p=0,05$ по следующей формуле.

$$P = e^{-cv} \quad \text{или} \quad c = \ln p / -v$$

c : концентрация инфекционных частиц в 1 мл

v : объем испытуемого образца (мл)

1.3. Расчет стандартного отклонения:

$$s_e = d * \sqrt{\sum \frac{p_i (1 - p_i)}{(n_i - 1)}}$$

p_i : наблюдаемая скорость реакции;

n_i : число определений;

d : логарифм степени разведения

1.4. Расчет доверительного интервала для $p = 0,95$:

$$C_{95\%} = \pm 2 * S_e$$

1.5. Расчет фактора вирус-инактивации:

$$R = (\log_{10} A_0) - (\log_{10} A_n)$$

A_0 : титр вируса/мл в исходном образце;

A_n : титр вируса/мл в образце после обработки и удаления метиленовой синьки

1.6. Стандартное отклонение: $S_{eR} = \sqrt{S_e A_0^2 + S_e A_n^2}$

III РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Показатели фотодинамической вирус-инактивации восьми тест-штаммов (на каждый вирус использовано по четыре независимых образцов плазмы), представлены в таблицах 4 — 11 (см. приложение). Полученные данные свидетельствуют о снижении инфекционной активности всех тест-штаммов ниже предела обнаружения. Итоговые результаты вирус-инактивации представлены в таблице 3. Следует отметить, что для вирусов гриппа и парагриппа 1-го типа дополнительным инактивирующим фактором являлось присутствие в плазме ингибиторов, подавляющих инфекционную активность этих вирусов. Поэтому в некоторых исходных образцах плазмы до фотодинамической обработки титр этих вирусов был сравнительно низким ($2,7 \log_{10}/\text{мл}$ для вируса гриппа и $3,7 \log_{10}/\text{мл}$ для вируса парагриппа 1-го типа). При достаточно высоких показателях титра испытуемых вирусов (5 и более $\log_{10}/\text{мл}$) в образцах плазмы до обработки, их инфекционная активность снижалась более чем на $4 \log_{10}/\text{мл}$, что подтверждает эффективность этого метода (6). Во всех случаях снижение титра было статистически значимым ($p=0,05$).

Не было выявлено интерферирующего действия образцов плазмы (в разведениях, не оказывающих токсическое или вирусингибирующее действие на куриные эмбрионы или цитотоксическое действие на клеточные культуры) на репродукцию испытуемых тест-штаммов вирусов (таблицы 4.2 — 11.2 приложения).

Таблица 3

Основные показатели фотодинамической инактивации тест-штаммов

Вирус гриппа, штамм А/Виктория/35/72 (H3N2)	Инфекционная активность, $\log_{10}/\text{мл}$			
	Плазма, пакет А	Плазма, пакет Б	Плазма, пакет В	Плазма, пакет Г
До обработки	5,20	4,94	2,90	2,70
После обработки и удаления метиленовой синьки	$\leq 0,80$	$\leq 0,80$	$\leq 0,80$	$\leq 0,80$
Снижение титра, \log_{10}	$\geq 4,40$	$\geq 4,14$	$\geq 2,10$	$\geq 1,90$
Вирусингибирующая активность плазмы в РТГА	1:10	1:20	1:80	1:80

Вирус инфекционно-го бронхита кур, штамм ИБК Н-120	Инфекционная активность, $\log_{10}/\text{мл}$			
	Плазма, пакет А	Плазма, пакет Б	Плазма, пакет В	Плазма, пакет Г
До обработки	5,70	4,45	5,20	4,95
После обработки и удаления метиленовой синьки	$\leq 0,80$	$\leq 0,80$	$\leq 0,80$	$\leq 0,80$
Снижение титра, \log_{10}	$\geq 4,90$	$\geq 3,65$	$\geq 4,40$	$\geq 4,15$

Вирус парагриппа 1-го типа, штамм Сендай	Инфекционная активность, $\log_{10}/\text{мл}$			
	Плазма, пакет А	Плазма, пакет Б	Плазма, пакет В	Плазма, пакет Г
До обработки	4,20	3,70	3,95	3,70
После обработки и удаления метиленовой синьки	$\leq 0,80$	$\leq 0,80$	$\leq 0,80$	$\leq 0,80$
Снижение титра, \log_{10}	$\geq 3,40$	$\geq 2,90$	$\geq 3,15$	$\geq 2,90$
Вирусингибирующая активность плазмы в РТГА	1:10	1:20	1:20	1:20

Аденовирус человека 5-го типа	Инфекционная активность, $\log_{10}/\text{мл}$			
	Плазма, пакет А	Плазма, пакет Б	Плазма, пакет В	Плазма, пакет Г
До обработки	6,25	6,37	6,50	6,37
После обработки и удаления метиленовой синьки	$\leq 1,17$	$\leq 1,17$	$\leq 1,17$	$\leq 1,17$
Снижение титра, \log_{10}	$\geq 5,33$	$\geq 5,16$	$\geq 5,33$	$\geq 5,20$

Вирус простого герпеса 1-го типа	Инфекционная активность, $\log_{10}/\text{мл}$			
	Плазма, пакет А	Плазма, пакет Б	Плазма, пакет В	Плазма, пакет Г
До обработки	6,65	6,80	6,73	6,68
После обработки и удаления метиленовой синьки	$\leq 1,17$	$\leq 1,17$	$\leq 1,17$	$\leq 1,17$
Снижение титра, \log_{10}	$\geq 5,48$	$\geq 5,63$	$\geq 5,56$	$\geq 5,51$

Цитомегаловирус человека	Инфекционная активность, $\log_{10}/\text{мл}$			
	Плазма, пакет А	Плазма, пакет Б	Плазма, пакет В	Плазма, пакет Г
До обработки	5,25	5,25	5,12	5,12
После обработки и удаления метиленовой синьки	$\leq 1,17$	$\leq 1,17$	$\leq 1,17$	$\leq 1,17$
Снижение титра, \log_{10}	$\geq 4,08$	$\geq 4,08$	$\geq 3,95$	$\geq 3,95$

Вирус гепатита уток, штамм "ВГНКИ-К"	Инфекционная активность, $\log_{10}/\text{мл}$			
	Плазма, пакет А	Плазма, пакет Б	Плазма, пакет В	Плазма, пакет Г
До обработки	5,20	5,20	5,45	5,20
После обработки и удаления метиленовой синьки	$\leq 0,80$	$\leq 0,80$	$\leq 0,80$	$\leq 0,80$
Снижение титра, \log_{10}	$\geq 4,40$	$\geq 4,40$	$\geq 4,65$	$\geq 4,40$

Вирус диареи телят, штамм «РП-82»	Инфекционная активность, $\log_{10}/\text{мл}$			
	Плазма, пакет А	Плазма, пакет Б	Плазма, пакет В	Плазма, пакет Г
До обработки	5,25	5,37	5,50	5,87
После обработки и удаления метиленовой синьки	$\leq 0,80$	$\leq 0,80$	$\leq 0,80$	$\leq 0,80$
Снижение титра, \log_{10}	$\geq 4,45$	$\geq 4,57$	$\geq 4,70$	$\geq 5,07$

IV ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инактивация вирусов в донорской плазме является в настоящее время актуальной проблемой трансфузиологии. Национальный стандарт Российской Федерации предусматривает контроль донорской крови, плазмы и продуктов ее переработки на присутствие следующих маркеров вирусов — возбудителей трансмиссивных заболеваний: HBs-антиген, антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и вирусу гепатита С (1). Однако продукты, полученные из крови доноров, даже прошедшие такой контроль, могут вызвать заражение реципиентов этими вирусами. Это связано с тем, что с момента инфицирования, т.е. появления вируса в крови, до появления вирусспецифических антител в количестве, достаточном для определения, может пройти несколько месяцев.

Для повышения безопасности при переливании крови Российская ассоциация трансфузиологов рекомендует в качестве дополнения использовать метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), который позволяет выявить РНК или ДНК возбудителя в пуле донорской сыворотки (11). Однако положительный результат ПЦР-анализа может свидетельствовать только о наличии вируса в плазме, но он не дает ответа на вопрос об его заражающей (инфекционной) активности. По этой причине ПЦР-анализ не может использоваться в качестве показателя инактивации вирусов в конечном продукте. Поэтому центральную роль в обеспечении вирусологической безопасности играет производственный процесс, включающий стадию инактивации инфекционной активности вирусов.

В настоящем исследовании проведена апробация системы фотодинамической инактивации вирусов в плазме "Theraflex-mb plasma". Эксперименты выполнены с соблюдением аттестованных требований для отбора тест-штаммов и методики инактивации вирусов (8). Были испытаны следующие тест штаммы, которые являются потенциальными контаминантами донорской плазмы:

- релевантные: вирус гриппа человека, парагриппа 1-го типа, аденовируса 5-го типа, герпеса человека 1-го типа, цитомегаловируса;
- модельные: гепатита уток (модельный для вируса гепатита В), диареи телят (модельный для вируса гепатита С) и инфекционного бронхита кур (модельный для коронавируса человека).

Каждый вирус был испытан на четырех независимых образцах плазмы. Результаты показали, что все тестируемые штаммы вирусов были инактивированы до уровня обнаружения при режиме освещения 180 Дж/см^2 .

Система для фотодинамической инактивации вирусов в донорской плазме в ходе испытаний показала, что однократная обработка плазмы приводит к значительному снижению (более $4 \log_{10}/\text{мл}$) инфекционной активности вирусов. Такая высокая степень

инактивации вирусов позволяет практически исключить риск передачи реципиентам при переливании обработанной плазмы вирусом-возбудителей заболеваний, которые могут присутствовать в крови доноров.

Таким образом, результаты апробации системы для фотодинамической инактивации вирусов "Theraflex-mb plasma", проведенной с использованием восьми релевантных и модельных тест-штаммов, дают основание рекомендовать ее для повышения безопасности донорской плазмы.

У СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Национальный стандарт российской федерации. «Правила производства и контроля качества лекарственных средств, good manufacturing practice for medicinal products (gmp)», ГОСТ 52249-2004, производство лекарственных средств из крови или плазмы человека (приложение 14), дата введения – 1 января 2005 г.
2. "О внедрении в практику работы службы крови в Российской Федерации метода карантинизации свежемороженой плазмы", приказ Минздрава РФ от 7 мая 2003 г. №193.
3. Mohr H., Lambrecht B., Selz A. Photodynamic virus inactivation of blood components, *Immunological Investigations*, 1995, 24 (1and 2), 73-85.
4. Надлежащая практика производства медицинских иммунобиологических препаратов, санитарно-эпидемиологические правила СП 3.3.2.1288-03., постановление МЗ РФ от 18 апреля 2003 г. № 60.
5. Guidance on the Manufacture of Human Plasma-Derived Products, Viral Safety Evaluation, 2001-04-01, 20 p.
6. Правила производства лекарственных средств - GMP Европейского Сообщества Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products., 1993, 108 с.
7. Исрафилов А.Г., Кудашева Г.Б., Еникеева Е.В., Нигматуллин Р.Р. Избранные вопросы валидации вирусологической безопасности препаратов плазмы крови человека в таблицах, филиал «Иммунопрепарат» ФГУП «НПО «Микроген», МЗ и СР РФ, г. Уфа, 2005, 33 с.
8. Validation of inactivation of pseudorabies virus in human plasma by treatment with methylene blue and light, *biomedizinische test GmbH*, 2003, 26 p.
9. Соминина А.А. Бурцева Е.И. Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация, Методические рекомендации, утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 18 апреля 2006 г. N 0100/4430-06-34.
10. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. М., ВНИТИБП, 1998, 928 с.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. methods.*, 65., 1983., p.p. 55-63.
12. Ёлов А. А., Федоров Н. А., Жибурт Е. Б. Универсальные технологии генотестирования донорской крови и других клинических материалов на патогены, Москва, 2005 г., 19 с.

VI ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 4

**Подтверждение инактивации тест-штамма А/Виктория/35/72 (H3N2)
в плазме человека при обработке метиленовым синим и светом**

Плазма, партия №№: (01_01 - 01_04)

Образец плазмы	Метка	Образец вируса	Наивысшее разведение испытуемого образца вызывающее инфицирование всех КЭ	Наблюдаемая степень реакции								log ₁₀ ЭИД ₅₀ /мл 95% доверит. интервал	Общий объем (мл)	log ₁₀ общая партия вируса 95% доверит. интервал	log ₁₀ фактор уменьшения 95% доверит. интервал	
				P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	сумма					
Плазма пакет А	01	Вирус исходный	1000000	1,00	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75	7,25±0,50	5,00	7,95±0,50	-
	01_01 до	Инфицир. испыт. образец	10000	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	5,20±0,00	300,00	7,68±0,00	-
	01_01 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤0,80±0,00	300,00	≤3,28±0,00	≥4,40±0,00	
Плазма пакет Б	01_02 до	Инфицир. испыт. образец	1000	1,00	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75	4,94±0,50	300,00	7,42±0,50	-
	01_02 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤0,80±0,00	300,00	≤3,28±0,00	≥4,14±0,50	
Плазма пакет В	01_03 до	Инфицир. испыт. образец	100	1,00	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75	2,90±0,50	300,00	5,38±0,28	-
	01_03 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤0,80±0,00	300,00	≤3,28±0,00	≥2,10±0,28	
Плазма пакет Г	01_04 до	Инфицир. испыт. образец	100	1,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	2,70±0,57	300,00	5,18±0,57	-
	01_04 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤0,80±0,00	300,00	≤3,28±0,00	≥1,90±0,57	

Коэффициент разведения: 10 Число тестированных куриных эмбрионов на разведение: 4

Таблица 4.1

Интерференция испытуемых образцов плазмы до обработки

Тест-вирус	Образец	Код	Конечное разведение испытуемого образца	Наивысшее разведение исходного вируса, вызывающее инфицирование всех эмбрионов	Наблюдаемые степени реакции								log ₁₀ ЭИД ₅₀ /мл 95% доверит. интервал	log ₁₀ фактор уменьшения 95% доверит интервал
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	Сум-ма		
Вирус гриппа А/Виктория/35/72	Исходный вирус	01	-	1000000	1,00	0,75	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	2,50	8,69±0,71	-
	Вирус содержащая плазма до обработки	01_01	1:100	1000000	1,00	0,75	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	2,25	8,45±0,76	0,24±1,04
		01_02		1000000	1,00	0,75	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	2,75	8,69±0,71	0,00±1,00
		01_03		1000000	1,00	0,50	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	2,25	8,45±0,76	0,24±1,04
01_04	1000000	1,00		0,50	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	2,25	8,45±0,76	0,24±1,04		

Коэффициент разведения: 10. Число тестируемых куриных эмбрионов на разведение: 4.

Таблица 4.2

Вирусингибирующая активность испытуемых образцов плазмы до обработки на куриных эмбрионах

Конечное разведение плазмы	Гемагглютинирующая активность вирусосодержащей аллантоической жидкости (ГАЕ/50 мкл)				
	Физраствор	Код плазмы крови			
		01_01-01_02	01_03	01_04	
1:2	256*	0	0	0	
1:5		0	0	0	
1:10		0	0	0	
1:50		78,0	107,6	128,0	
1:100		256,0	256,0	256,0	

* в таблице приведены среднегеометрические показатели в обратных величинах

**Подтверждение инактивации вируса инфекционного бронхита кур (штамм ИБК-Н-120)
в плазме человека при обработке метиленовым синим и светом**

Плазма, партия №№: (02_01 - 02_04)

Образец плазмы	Метка	Образец вируса	Наивысшее разведение испытуемого образца вызывающее инфицирование всех КЭ	Наблюдаемая степень реакции								log ₁₀ ЭИД ₅₀ /мл 95% доверит. интервал	Общий объем (мл)	log ₁₀ общая партия вируса 95% доверит. интервал	log ₁₀ фактор уменьшения 95% доверит. интервал	
				P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	сумма					
Плазма пакет А	02	Вирус исходный	1000000	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75	7,20±0,00	20,00	8,50±0,00	-
	02_01 до	Инфицир. испыт. образец	10000	1,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	5,70±0,58	300,00	8,18±0,58	-
	02_01 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤ 0,80±0,00	300,00	≤ 3,28±0,00	≥ 4,90±0,58	
Плазма пакет Б	02_02 до	Инфицир. испыт. образец	10	1,00	0,75	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75	4,45±0,76	300,00	6,93±0,76	-
	02_02 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤ 0,80±0,00	300,00	≤ 3,28±0,00	≥ 3,65±0,76	
Плазма пакет В	02_03 до	Инфицир. испыт. образец	100	1,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75	5,20±0,58	300,00	7,68±0,28	-
	02_03 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤ 0,80±0,00	300,00	≤ 3,28±0,00	≥ 4,40±0,28	
Плазма пакет Г	02_04 до	Инфицир. испыт. образец	100	1,00	0,50	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	4,95±0,76	300,00	7,43±0,57	-
	02_04 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤ 0,80±0,00	300,00	≤ 3,28±0,00	≥ 4,15±0,57	

Коэффициент разведения: 10 Число тестированных куриных эмбрионов на разведение: 4

Таблица 5.1

Интерференция испытуемых образцов плазмы до обработки

Тест-вирус	Образец	Код	Конечное разведение испытуемого образца	Наивысшее разведение исходного вируса, вызывающее инфицирование всех эмбрионов	Наблюдаемые степени реакции								log ₁₀ ЭИД ₅₀ /мл 95% доверит. интервал	log ₁₀ фактор уменьшения 95% доверит интервал
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	Сум-ма		
Вирус инфекционного бронхита кур	Исходный вирус	02	-	100000	1,00	0,75	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	2,25	7,45±0,76	-
	Вирус содержащая плазма до обработки	02_01	1:10	100000	1,00	0,75	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	7,20±0,71	0,25±1,04
		02_02 02_03	1:10	100000	1,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	6,70±0,58	0,75±0,95
		02_04	1:5	100000	1,00	0,50	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	2,25	7,45±0,76	0,00±1,07

Коэффициент разведения: 10. Число тестируемых куриных эмбрионов на разведение: 4

Таблица 5.2

Эмбрионотоксическое действие испытуемых образцов плазмы до обработки на куриных эмбрионах

Конечное разведение плазмы	Наличие (+) или отсутствие (-) эмбрионотоксического действия плазмы			
	Физраствор	Код плазмы крови		
		01_01	01_02 - 01_03	01_04
Цельная	-	+	+	+
1: 5		+	+	-
1:10		-	-	-

**Подтверждение инактивации вируса парагриппа 1-го типа (штамм Сендай)
в плазме человека при обработке метиленовым синим и светом**

Плазма, партия №№: (03_01 - 03_04)

Образец плазмы	Метка	Образец вируса	Наивысшее разведение испытуемого образца вызывающее инфицирование всех КЭ	Наблюдаемая степень реакции								log ₁₀ ЭИД ₅₀ /мл 95% доверит. интервал	Общий объем (мл)	log ₁₀ общая партия вируса 95% доверит. интервал	log ₁₀ коэфф. уменьшения 95% доверит. интервал	
				P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	сумма					
Плазма пакет А	03	Вирус исходный	10000	1,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,25	6,45±0,50	15,00	7,63±0,50	-
	03_01 до	Инфицир. испыт. образец	100	1,00	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	4,20±0,82	300,00	6,68±0,82	-
	03_01 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤ 0,80±0,00	300,00	≤ 3,28±0,00	≥ 3,40±0,82	
Плазма пакет Б	03_02 до	Инфицир. испыт. образец	100	1,00	0,25	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	3,70±0,71	300,00	6,18±0,71	-
	03_02 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤ 0,80±0,00	300,00	≤ 3,28±0,00	≥ 2,90±0,71	
Плазма пакет В	03_03 до	Инфицир. испыт. образец	100	1,00	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75	3,95±0,50	300,00	6,43±0,50	-
	03_03 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤ 0,80±0,00	300,00	≤ 3,28±0,00	≥ 3,15±0,50	
Плазма пакет Г	03_04 до	Инфицир. испыт. образец	100	1,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	3,70±0,58	300,00	6,18±0,58	-
	03_04 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤ 0,80±0,00	300,00	≤ 3,28±0,00	≥ 2,90±0,58	

Коэффициент разведения: 10 Число тестированных куриных эмбрионов на разведение: 4

Таблица 6.1

Интерференция испытуемых образцов плазмы до обработки

Тест-вирус	Образец	Код	Конечное разведение испытуемого образца	Наивысшее разведение исходного вируса, вызывающее инфицирование всех эмбрионов	Наблюдаемые степени реакции								log ₁₀ ЭИД ₅₀ /мл 95% доверит. интервал	log ₁₀ фактор уменьшения 95% доверит интервал
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	Сум-ма		
Вирус парагриппа 1-го типа	Исходный вирус	03	-	10000	1,00	0,75	0,50	0,25	0,00	0,00	0,00	2,50	6,70±0,91	-
	Вирус содержащая плазма до обработки	03_01 03_03	1:5	10000	1,00	0,50	0,50	0,25	0,00	0,00	0,00	2,25	6,45±0,96	0,25±1,32
		03_02 03_04	1:10	10000	1,00	0,75	0,50	0,25	0,00	0,00	0,00	2,75	6,70±0,91	0,00±1,29

Коэффициент разведения: 10. Число тестируемых куриных эмбрионов на разведение: 4.

Таблица 6.2

Вирусингибирующая активность испытуемых образцов плазмы до обработки на куриных эмбрионах

Конечное разведение плазмы	Гемагглютинирующая активность вирусосодержащей аллантоисной жидкости (ГАЕ/50 мкл)		
	Физраствор	Код плазмы крови	
		03 01 - 03 03	03 02 - 03 04
1:2	128*	2	4
1: 5		128	90
1:10		128	128

* в таблице приведены среднегеометрические показатели в обратных величинах

**Подтверждение инактивации тест-штамма аденовируса человека 5-го типа
в плазме человека при обработке метиленовым синим и светом**

Плазма, партия №№: (04_01 - 04_04)

Образец плазмы	Метка	Образец вируса	Наивысшее разведение испытуемого образца вызывающее инфицирование всех культур	Наблюдаемая степень реакции								log ₁₀ ТЦПД ₅₀ /мл 95% доверит. интервал	Общий объем (мл)	log ₁₀ общая партия вируса 95% доверит. интервал	log ₁₀ фактор уменьшения 95% доверит. интервал
				P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	сумма				
Плазма пакет А	04	Вирус исходный	100000	1,00	0,75	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	2,25	7,75±0,85	30,00	9,23±0,85	-
	04_01 до	Инфицир. испыт. образец	10000	1,00	0,50	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75	6,25±0,65	300,00	8,73±0,65	-
	04_01 после	Обработка метил. синим	-	200 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤1,17±0,00	300,00	≤3,65±0,00	≥5,33±0,65
Плазма пакет Б	04_02 до	Инфицир. испыт. образец	10000	1,00	0,50	0,25	0,13	0,00	0,00	0,00	1,88	6,37±0,80	300,00	8,85±0,80	-
	04_02 после	Обработка метил. синим	-	200 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤1,17±0,00	300,00	≤3,65±0,00	≥5,16±0,80
Плазма пакет В	04_03 до	Инфицир. испыт. образец	10000	1,00	0,75	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	6,50±0,76	300,00	8,98±0,76	-
	04_03 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤1,17±0,00	300,00	≤3,65±0,00	≥5,33±0,76
Плазма пакет Г	04_04 до	Инфицир. испыт. образец	10000	1,00	0,50	0,13	0,25	0,00	0,00	0,00	1,88	6,37±0,80	300,00	8,85±0,80	-
	04_04 после	Обработка метил. синим	-	200 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤1,17±0,00	300,00	≤3,65±0,00	≥5,20±0,80

Коэффициент разведения: 10 Число тестированных куриных эмбрионов на разведение: 8

Таблица 7.1

Интерференция испытуемых образцов плазмы до обработки

Тест-вирус	Образец	Код	Конечное разведение испытуемого образца	Наивысшее разведение исходного вируса, вызывающее инфицирование всех эмбрионов	Наблюдаемые степени реакции								log ₁₀ ТЦПД ₅₀ /мл 95% доверит. интервал	log ₁₀ фактор уменьшения 95% доверит интервал
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	Сум-ма		
Аденовирус человека 5-го типа	Исходный вирус	04	-	100000	1,00	0,75	0,50	0,13	0,00	0,00	0,00	2,38	7,87±0,89	-
	Вирус содержащая плазма до обработки	04_01 04_03	1: 400	100000	1,00	0,75	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	2,25	7,75±0,85	0,12±1,23
		04_02 04_04		100000	1,00	0,50	0,37	0,13	0,00	0,00	0,00	1,87	7,50±0,76	0,37±1,17

Коэффициент разведения: 10. Число тестируемых культур на разведение: 8

Таблица 7.2

Токсичность испытуемых образцов плазмы на клетках Vero

Конечное разведение	Количество живых клеток (% к контролю) в образцах плазмы №№	
	04_01— 04_03	04_02 — 04_04
1:160	39,2*	36,5
1:320	98,2	98,5
1:640	101,7	102,7

* Среднее арифметическое значение из 10 повторностей

Таблица 8

**Подтверждение инаktivации тест-штамма вируса простого герпеса 1-го типа
в плазме человека при обработке метиленовым синим и светом**

Плазма, партия №№: (05_01 - 05_04)

Образец плазмы	Метка	Образец вируса	Наивысшее разведение испытуемого образца вызывающее инфицирование всех культур	Наблюдаемая степень реакции								log ₁₀ ТЦПД ₅₀ /мл 95% доверит. интервал	Общий объем (мл)	log ₁₀ общая партия вируса 95% доверит. интервал	log ₁₀ фактор уменьшения 95% доверит. интервал	
				P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	сумма					
Плазма пакет А	05	Вирус исходный	1000000	1,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,25	7,70±0,38	30,00	9,20±0,38	-
	05_01 до	Инфицир. испыт. образец	100000	1,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,13	6,65±0,27	300,00	9,13±0,27	-
	05_01 после	Обработка метил. синим	-	200 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤1,17±0,00	300,00	≤3,65±0,00	≥5,48±0,27	
Плазма пакет Б	05_02 до	Инфицир. испыт. образец	100000	1,00	0,13	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,26	6,80±0,39	300,00	9,28±0,39	-
	05_02 после	Обработка метил. синим	-	200 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤1,17±0,00	300,00	≤3,65±0,00	≥5,63±0,39	
Плазма пакет В	05_03 до	Инфицир. испыт. образец	10000	1,00	0,50	0,37	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	2,24	6,73±0,84	300,00	9,21±0,84	-
	05_03 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤1,17±0,00	300,00	≤3,65±0,00	≥5,56±0,84	
Плазма пакет Г	05_04 до	Инфицир. испыт. образец	10000	1,00	0,50	0,50	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	6,68±0,85	300,00	9,16±0,85	-
	05_04 после	Обработка метил. синим	-	200 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤1,17±0,00	300,00	≤3,65±0,00	≥5,51±0,85	

Коэффициент разведения: 10 Число тестируемых куриных эмбрионов на разведение: 8

Таблица 8.1

Интерференция испытуемых образцов плазмы до обработки

Тест-вирус	Образец	Код	Конечное разведение испытуемого образца	Наивысшее разведение исходного вируса, вызывающее инфицирование всех эмбрионов	Наблюдаемые степени реакции								log ₁₀ ТЦПД ₅₀ /мл 95% доверит. интервал	log ₁₀ фактор уменьшения 95% доверит. интервал
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	Сум-ма		
Вирус герпеса 1-го типа	Исходный вирус	05	-	10000	1,00	0,75	0,75	0,50	0,00	0,00	0,00	3,00	7,75±1,07	-
	Вирус содержащая плазма до обработки	05_01	1: 400	10000	1,00	0,75	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00	2,75	7,25±1,00	0,50±1,46
		05_02 05_03 05_04		10000	1,00	0,75	0,50	0,50	0,13	0,00	0,00	2,88	7,37±0,38	0,25±1,14

Коэффициент разведения: 10. Число тестируемых культур на разведение: 8

Таблица 8.2

Токсичность испытуемых образцов плазмы на клетках Vero

Конечное разведение	Количество живых клеток (% к контролю) в образцах плазмы №№	
	05_01	05_02 — 0,5_04
1:160	28,3*	42,3
1:320	95,6	101,6
1:640	100,4	100,3

* Среднее арифметическое значение из 10 повторностей

Таблица 9

**Подтверждение инактивации тест-штамма цитомегаловируса человека
в плазме человека при обработке метиленовым синим и светом**

Плазма, партия №№: (06_01 - 06_04)

Образец плазмы	Метка	Образец вируса	Наивысшее разведение испытуемого образца вызывающее инфицирование всех культур	Наблюдаемая степень реакции								log ₁₀ ТЦПД ₅₀ /мл 95% доверит. интервал	Общий объем (мл)	log ₁₀ общая партия вируса 95% доверит. интервал	log ₁₀ фактор уменьшения 95% доверит. интервал	
				P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	сумма					
Плазма пакет А	06	Вирус исходный	100000	1,00	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75	6,25±0,65	30,00	7,73±0,65	-
	06_01 до	Инфицир. испыт. образец	1000	1,00	0,62	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75	5,25±0,65	300,00	7,73±0,65	-
	06_01 после	Обработка метил. синим	-	200 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤1,17±0,00	300,00	≤3,65±0,00	≥4,08±0,65	
Плазма пакет Б	06_02 до	Инфицир. испыт. образец	1000	1,00	0,50	0,13	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	1,76	5,25±0,66	300,00	7,73±0,66	-
	06_02 после	Обработка метил. синим	-	200 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤1,17±0,00	300,00	≤3,65±0,00	≥4,08±0,66	
Плазма пакет В	06_03 до	Инфицир. испыт. образец	1000	1,00	0,37	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,82	5,12±0,60	300,00	7,60±0,60	-
	06_03 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤1,17±0,00	300,00	≤3,65±0,00	≥3,95±0,60	
Плазма пакет Г	06_04 до	Инфицир. испыт. образец	1000	1,00	0,50	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,63	5,12±0,60	300,00	7,60±0,60	-
	06_04 после	Обработка метил. синим	-	200 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤1,17±0,00	300,00	≤3,65±0,00	≥3,95±0,60	

Коэффициент разведения: 10 Число тестированных куриных эмбрионов на разведение: 8

Таблица 9.1

Интерференция испытуемых образцов плазмы до обработки

Тест-вирус	Образец	Код	Конечное разведение испытуемого образца	Наивысшее разведение исходного вируса, вызывающее инфицирование всех эмбрионов	Наблюдаемые степени реакции								log ₁₀ ТЦПД ₅₀ /мл 95% доверит. интервал	log ₁₀ фактор уменьш. 95% доверит интервал
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	Сумма		
Цитомегаловирус человека	Исходный вирус	06	-	100000	1,00	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	6,50±0,76	-
	Вирус содержащая плазма до обработки	06_01 06_04	1: 400	100000	1,00	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75	6,25±0,65	0,25±1,00
		06_02 06_03		100000	1,00	0,50	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	1,87	6,40±0,70	0,10±1,07

Коэффициент разведения: 10. Число тестируемых культур на разведение: 8

Таблица 9.2

Токсичность испытуемых образцов плазмы на клетках ФЛЭЧ

Конечное разведение	Количество живых клеток (% к контролю) в образцах плазмы №№	
	06_01—06_04	06_02—06_03
1:160	34,2*	39,5
1:320	93,2	91,5
1:640	101,5	100,7

* Средне арифметическое значение из 10 повторностей

Таблица 10

**Подтверждение инактивации тест-штамма вируса гепатита уток
в плазме человека при обработке метиленовым синим и светом**

Плазма, партия №№: (07_01 - 07_04)

Образец плазмы	Метка	Образец вируса	Наивысшее разведение испытуемого образца вызывающее инфицирование всех КЭ	Наблюдаемая степень реакции								log ₁₀ ЭЛД ₅₀ /мл 95% доверит. интервал	Общий объем (мл)	log ₁₀ общая партия вируса 95% доверит. интервал	log ₁₀ фактор уменьшения 95% доверит. интервал	
				P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	сумма					
Плазма пакет А	07	Вирус исходный	100000	1,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	6,70±0,58	20,00	8,00±0,50	-
	07_01 до	Инфицир. испыт. образец	1000	1,00	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	5,20±0,82	300,00	7,68±0,00	-
	07_01 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤0,80±0,00	300,00	≤3,28±0,00	≥4,40±0,82	
Плазма пакет Б	07_02 до	Инфицир. испыт. образец	1000	1,00	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	5,20±0,82	300,00	7,68±0,50	-
	07_02 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤0,80±0,00	300,00	≤3,28±0,00	≥4,40±0,82	
Плазма пакет В	07_03 до	Инфицир. испыт. образец	1000	1,00	0,75	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75	5,45±0,76	300,00	7,93±0,28	-
	07_03 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤0,80±0,00	300,00	≤3,28±0,00	≥4,65±0,76	
Плазма пакет Г	07_04 до	Инфицир. испыт. образец	1000	1,00	0,50	0,25	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	5,20±0,91	300,00	7,68±0,57	-
	07_04 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤0,80±0,00	300,00	≤3,28±0,00	≥4,40±0,91	

Коэффициент разведения: 10 Число тестированных куриных эмбрионов на разведение: 4

Таблица 10.1

Интерференция испытуемых образцов плазмы до обработки

Тест-вирус	Образец	Код	Конечное разведение испытуемого образца	Наивысшее разведение исходного вируса, вызывающее инфицирование всех эмбрионов	Наблюдаемые степени реакции								log ₁₀ ЭЛД ₅₀ /мл 95% доверит. интервал	log ₁₀ фактор уменьшения 95% доверит. интервал
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	Сум-ма		
Вирус гепатита уток	Исходный вирус	07	-	100000	1,00	0,75	0,25	0,50	0,00	0,00	0,00	2,50	7,70±0,91	-
	Вирус-содержащая плазма до обработки	07_01 07_04	1:5	100000	1,00	0,75	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	2,50	7,45±0,76	0,25±1,19
		07_02 07_03	1:10	100000	1,00	0,50	0,25	0,25	0,00	0,00	0,00	2,00	7,20±0,91	0,50±1,29

Коэффициент разведения: 10. Число тестируемых куриных эмбрионов на разведение: 4.

Таблица 10.2

Эмбрионотоксическое действие испытуемых образцов плазмы до обработки на куриных эмбрионах

Конечное разведение плазмы	Наличие (+) или отсутствие (-) эмбрионотоксического действия плазмы		
	Физраствор	Код плазмы крови	
		07_01 - 07_04	07_02 - 07_03
Цельная	-	+	+
1:2		+	+
1:5		-	+
1:10		-	-

Таблица 11

**Подтверждение инактивации тест-штамма вируса диареи телят
в плазме человека при обработке метиленовым синим и светом**

Плазма, партия №№: (08_01 - 08_04)

Образец плазмы	Метка	Образец вируса	Наивысшее разведение испытуемого образца вызывающее инфицирование всех культур	Наблюдаемая степень реакции								log ₁₀ ТЦПД ₅₀ /мл 95% доверит. интервал	Общий объем (мл)	log ₁₀ общая партия вируса 95% доверит. интервал	log ₁₀ фактор уменьшения 95% доверит. интервал
				P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	сумма				
Плазма пакет А	08	Вирус исходный	10000	1,00	0,50	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75	6,25±0,50	20,00	7,55±0,50	-
	08_01 до	Инфицир. испыт. образец	1000	1,00	0,50	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	5,25±0,50	300,00	7,72±0,50	-
	08_01 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤0,80±0,00	300,00	≤3,28±0,00	≥4,45±0,50
Плазма пакет Б	08_02 до	Инфицир. испыт. образец	1000	1,00	0,60	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	1,85	5,37±0,49	300,00	7,85±0,49	-
	08_02 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤0,80±0,00	300,00	≤3,28±0,00	≥4,57±0,49
Плазма пакет В	08_03 до	Инфицир. испыт. образец	1000	1,00	0,75	0,13	0,13	0,00	0,00	0,00	2,01	5,50±0,49	300,00	7,98±0,49	-
	08_03 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤0,80±0,00	300,00	≤3,28±0,00	≥4,70±0,49
Плазма пакет Г	08_04 до	Инфицир. испыт. образец	1000	1,00	0,88	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	2,38	5,87±0,45	300,00	8,34±0,57	-
	08_04 после	Обработка метил. синим	-	500 мкл тестировано, вирус отсутствует								≤0,80±0,00	300,00	≤3,28±0,00	≥5,07±0,45

Коэффициент разведения: 10 Число тестированных культур на разведение: 8

Таблица 11.1

Интерференция испытуемых образцов плазмы до обработки

Тест-вирус	Образец	Код	Конечное разведение испытуемого образца	Наивысшее разведение исходного вируса, вызывающее инфицирование всех эмбрионов	Наблюдаемые степени реакции								log ₁₀ ТЦПД ₅₀ /мл 95% доверит. интервал	log ₁₀ фактор уменьшения 95% доверит интервал
					P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	Сум-ма		
Вирус диареи телят	Исходный вирус	08	-	10000	1,00	0,75	0,75	0,25	0,13	0,00	0,00	2,88	7,37±0,62	-
	Вирус со-держащая плазма до обработки	08_01	1:100	10000	1,00	0,75	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00	2,75	7,25±0,63	0,12±0,88
		08_03		10000	1,00	0,50	0,50	0,25	0,13	0,00	0,00	2,38	6,87±0,68	0,50±0,92
		08_02 08_04		10000	1,00	0,50	0,50	0,13	0,25	0,00	0,00	2,38	6,87±0,68	0,50±0,92

Коэффициент разведения: 10. Число тестируемых культур на разведение: 8

Таблица 11.2

Токсичность испытуемых образцов плазмы на клетках МА-104

Конечное разведение	Количество живых клеток (% к контролю)		
	08_01	08_03	08_02 - 08_04
1:5	28,3*	25,1	31,4
1:10	54,3	35,6	44,5
1:50	78,2	66,9	78,8
1:100	101,2	98,5	103,5

* Среднее арифметическое значение из 10 повторностей