

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения специфической (иммуногенной) активности адсорбированного столбнячного анатоксина, входящего в состав моно- и комбинированных вакцин. Специфическую активность столбнячного анатоксина определяют по его способности защищать иммунизированных животных от заражения столбнячным токсином и выражают в количестве Международных единиц (МЕ) активности, содержащихся в 1 мл или 1 прививочной дозе (0,5 мл). Активность столбнячного анатоксина в МЕ/мл рассчитывают путем сопоставления его количества и количества соответствующего референс-препарата, калиброванного в МЕ, необходимых для защиты 50% животных от летального заражения

столбнячным токсином (LD_{50}). Для определения специфической активности используют метод множественных разведений. При стабильно воспроизводимых показателях активности адсорбированного столбнячного анатоксина и стандартной технологии производства возможно использование метода с одним разведением.

Метод множественных разведений

Разными дозами испытуемого препарата иммунизируют не менее 3 групп мышей по 12-16 животных в группе. Не менее 3 аналогичных групп животных иммунизируют разными дозами референс-препарата, калиброванного в МЕ. Разведения вакцины и референс-препаратов выбирают таким образом, чтобы наименьшая доза защищала от заражения не более 20%, а наибольшая доза - не менее 80% иммунизированных животных. Следует избегать разведений испытуемых образцов, при которых наблюдается гибель или выживаемость 100% иммунизированных животных.

Через 28 сут животным вводят по $50 LD_{50}$ столбнячного токсина. Наблюдение проводят в течение 4 сут, регистрируя число выживших животных, и рассчитывают величины ED_{50} (статистически определяемая доза вакцины или референс-препарата, защищающая от гибели 50% иммунизированных животных в течение 4 сут) для вакцины (в мл) и референс-препарата (в МЕ). На основании полученных результатов определяют количество МЕ в 1 мл вакцины.

Материалы и животные:

- референс-препарат (стандартный образец активности адсорбированного столбнячного анатоксина, калиброванный в МЕ по соответствующему международному стандартному образцу);

- испытуемый образец;

- столбнячный токсин с предварительно установленной дозой LD_{50} (статистически определяемая доза токсина, вызывающая гибель 50% животных в течение 4 сут);

- белые мыши с массой тела 16-18 г.

Примечания.

1. Приготовление разведений референс-препарата. Референс-препарат разводят стерильным 0,9% раствором натрия хлорида, рН $(7,0 \pm 0,2)$, и готовят не менее 3 последовательных разведений с двойным шагом (например: 0,5, 1,0 и 2 МЕ/0,5 мл).

2. Приготовление разведений испытуемого образца вакцины. Разведения испытуемого образца готовят, соблюдая те же условия, что и при приготовлении разведений референс-препарата.

Иммунизация животных

Разведения референс-препарата и испытуемого образца анатоксина вводят по 0,5 мл мышам в соответствующих группах однократно под кожу в область внутренней поверхности верхней трети бедра.

Введение столбнячного токсина

По истечении 28 сут всем иммунизированным животным вводят под кожу внутренней поверхности верхней трети бедра по $(50 \pm 10) LD_{50}$ столбнячного токсина в объеме 0,5 мл. Опыт сопровождают контролем величины LD_{50} столбнячного токсина. Для этого неиммунизированным мышам из той же партии, разделенным на 3 группы (не менее 4 мышей в каждой группе), вводят столбнячный токсин в дозах 0,5, 1 и $2 LD_{50}$. За иммунизированными животными и животными контрольной группы наблюдают 4 сут, регистрируя число выживших мышей без явлений столбняка.

На основании полученных результатов производят расчет иммуногенной активности столбнячного анатоксина с помощью статистических программ, включающих Probit analysis, или по формуле Кербера, определяя величины ED_{50} для референс-препарата и испытуемой вакцины. Также рассчитывают количество LD_{50} токсина, введенного иммунизированным животным.

Формула Кербера:

- для испытуемого образца и референс-препарата:

$$\lg ED_{50} = \lg D_N - \sigma \left(\sum Li - 0,5 \right) ,$$

- для токсина:

$$\lg LD_{50} = \lg D_N - \sigma \left(\sum Li - 0,5 \right) ,$$

где: D_N - величина максимальной из испытуемых доз;

σ - логарифм кратности разведения (отношение большей дозы к следующей за ней меньшей дозе);

Li - отношение количества выживших мышей без явлений столбняка (для LD_{50} - павших) к общему числу животных, получивших данную дозу;

$\sum Li$ - сумма значений Li , найденных для всех испытуемых доз.

Испытание считается проведенным правильно, если:

- вычисленное значение ED_{50} для испытуемого образца анатоксина и референс-препарата лежит между значениями наибольшей и наименьшей дозы препаратов, введенных животным;
- пределы доверительного интервала ($P = 0,95$) не менее 50% и не более 200% от величины вычисленной активности;
- разрешающая доза столбнячного токсина приблизительно равна $50 LD_{50}$.

Метод с одним разведением

Если при испытании не менее 10 серий вакцины подтверждена стабильность и соответствие требованиям нормативной документации показателя иммуногенности столбнячного анатоксина, возможно использование метода с одним разведением. Принцип метода заключается в сравнении активности единичных разведений вакцины и референс-препарата, калиброванного в МЕ.

По данным тестов с 3 разведениями выбирают дозу референс-препарата, обеспечивающую выживаемость 10-20% иммунизированных животных при заражении разрешающей дозой токсина. Разведение вакцины готовят с таким расчетом, чтобы получить подтверждение того, что ее активность значительно выше минимально требуемой.

Животных делят на 2 группы (не менее 12 животных в каждой), одну из которых иммунизируют вакциной, а другую - референс-препаратом. Препараты вводят подкожно в объеме 0,5 мл. Через 28 сут всем иммунизированным животным вводят разрешающую дозу столбнячного токсина (50 ± 10) LD_{50} в объеме 0,5 мл. Опыт сопровождают контролем величины LD_{50} столбнячного токсина. За животными наблюдают 4 сут, регистрируя число выживших животных без явлений столбняка в каждой группе. Результаты выражают как отношение числа выживших без явлений столбняка мышей в каждой группе к общему числу животных, получивших данную дозу вакцины или референс-препарата. В опытной группе количество выживших животных должно быть достоверно выше, чем в контроле. Достоверность различия определяют с помощью точного критерия Фишера (одностороннего, $P < 0,05$). При значении $P \geq 0,05$ различия считаются недостоверными (табл.).

Таблица - Расчет значения доверительного интервала (P)

Группа	Количество испытуемых животных		
	Выжило	Пало	Всего
Опыт	a	b	T
Контроль	c	d	R
Всего	n+	n-	N

Вычисление P проводят по формуле:

$$P = \frac{(n+)! (n-)! T! R!}{a! b! c! d! N!}$$

где: ! - знак факториала (означает произведение всех натуральных чисел от 1 до числа, стоящего перед знаком "!" включительно).

Если показатель иммуногенности столбнячного анатоксина при испытании методом с одним разведением не соответствует требованиям нормативной документации, испытание повторяют методом множественных разведений.