

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Определение содержания

ОФС.1.7.2.0032.15

анатоксинов в реакции

антитоксинсвязывания

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на определение содержания анатоксинов в реакции антитоксинсвязывания, которая основана на способности анатоксинов образовывать комплекс антиген – антитело со специфическими антитоксинами. При внесении в раствор анатоксина определенного количества соответствующего антитоксина часть последнего связывается с анатоксином в эквивалентном соотношении. Содержание не связавшегося антитоксина определяют по его токсиннейтрализующей способности. На основании полученных результатов определяют содержание анатоксина в испытуемом растворе.

Для проведения испытания используют стандартные образцы антитоксинов, калиброванные в Международных единицах (МЕ). Количество анатоксина, которое связывает 1 МЕ соответствующего антитоксина, принимают за 1 единицу связывания (ЕС). Специфическую активность анатоксинов, определяемую в реакции антитоксинсвязывания, выражают в ЕС/мл.

ИСПЫТАНИЯ

Перед проведением испытания устанавливают опытную дозу токсинов, используемых при определении содержания антитоксинов в испытуемой среде.

Столбнячный анатоксин

За опытную дозу принимают минимальное количество столбнячного

токсина, которое при введении мышам в смеси с 0,01 МЕ столбнячного антитоксина вызывает гибель 50 % животных в течение 4 сут.

При определении опытной дозы готовят не менее 7 последовательных разведений токсина в 0,9 % растворе натрия хлорида, отличающихся одно от другого на 10 – 20 %. В ряд пробирок вносят по 1 мл столбнячного антитоксина, содержащего 0,1 МЕ, 1 мл одного из разведений токсина и 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Смеси инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (45 ± 2) мин и вводят 4 белым мышам массой тела 16 -18 г подкожно в объеме 0,4 мл. За животными наблюдают в течение 4 сут, регистрируя количество павших от каждого разведения токсина. В результате испытания отмечают наибольшее разведение токсина, вызвавшее гибель 50 % животных в группе. Готовят разведение токсина, содержащее 10 опытных доз в 1 мл.

Для использования в опыте антитоксинсвязывания готовят разведение токсина.

Проведение реакции антитоксинсвязывания

Исходя из предполагаемого содержания анатоксина в растворе, готовят несколько его последовательных разведений до 0,1 ЕС/мл, отличающихся друг от друга на 10–25 % (табл.). Подготовленные разведения вносят по 1 мл во флаконы и добавляют по 0,2 МЕ столбнячного антитоксина в объеме 2 мл. Смеси тщательно перемешивают и инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (45 ± 2) мин для связывания анатоксина с антитоксином. После окончания инкубации определяют содержание оставшегося свободным антитоксина. С этой целью в каждый флакон вносят 1 мл токсина, содержащего 10 опытных доз. Смеси инкубируют при тех же условиях и вводят группам мышей (не менее 4 животных в каждой) подкожно по 0,4 мл.

Испытания проводят совместно с контролем опытной дозы токсина. Смесь, состоящую из 2 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, 1 мл раствора столбнячного антитоксина (0,1 МЕ/мл) и 1 мл раствора токсина,

содержащего 10 опытных доз, инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение (45 ± 2) мин и вводят мышам подкожно по 0,4 мл.

За животными опытной и контрольной групп наблюдают в течение 4 сут, регистрируя появление симптомов заболевания у животных в каждой группе. Мышей с признаками столбняка усыпляют. Результат выражают как отношение количества выживших животных к общему количеству животных в каждой группе. Отмечают разведение анатоксина с наименьшей предполагаемой активностью, которое при введении мышам опытной группы вызвало такой же эффект, как у мышей контрольной группы. Это означает, что из 0,2 МЕ столбнячного антитоксина, находившихся в смеси, 0,1 МЕ антитоксина не связалась с анатоксином и вступила в реакцию нейтрализации токсина. Следовательно, 0,1 МЕ антитоксина связала анатоксин и его активность равна 0,1 ЕС/мл. Для определения содержания анатоксина в исходном растворе учитывают его разведение (табл.).

Таблица – Схема приготовления разведений испытуемого анатоксина

Показатель	№ флакона (разведения)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Предполагаемая активность анатоксина ЕС/мл	200	250	300	350	400	450	500	550	600
Количество анатоксина в разведении 1:100 мл	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Количество 0,9 % раствора натрия хлорида мл	19	24	29	34	39	44	49	54	59

Ботулинические анатоксины типов А, В и Е

Перед проведением испытания устанавливают опытную дозу ботулинических токсинов типов А, В и Е, используемых в реакции

АНТИТОКСИНСВЯЗЫВАНИЯ.

За опытную дозу ($L^+/50$) ботулинических токсинов типов А, В и Е принимают минимальное количество токсина, которое при внутривенном введении мышам в смеси с $1/50$ МЕ соответствующего антитоксина вызывает гибель 50 % животных в течение 4 сут.

Для определения опытной дозы готовят 5 – 7 последовательных разведений токсина в 0,9 % растворе натрия хлорида, отличающихся одно от другого на 10 – 20 %. Для этого в ряд пробирок вносят по 1,5 мл одного из разведений токсина, 1 мл соответствующего антитоксина, содержащего 0,1 МЕ, и 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Смеси инкубируют в термостате при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (45 ± 1) мин и вводят группам белых мышей с массой тела 16 – 18 г (не менее 4 животных в каждой группе) внутривенно в объеме 0,7 мл. За животными наблюдают в течение 4 сут, учитывая количество павших животных от каждого разведения токсина. Наибольшее разведение токсина, вызвавшее гибель 50 % животных в группе, считают рабочим разведением (1,5 мл этого разведения содержат 5 опытных доз).

Проведение реакции антитоксинсвязывания

Исходя из предполагаемого содержания анатоксина в испытуемом препарате, готовят несколько его последовательных разведений в 0,9 % растворе натрия хлорида, отличающихся друг от друга на 10 – 25 % до 0,1 ЕС/мл (табл.). По 1 мл одного из разведений анатоксина помещают во флаконы и добавляют по 1 мл соответствующего антитоксина, содержащего 0,2 МЕ. Смеси тщательно перемешивают и инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (45 ± 1) мин. Во время инкубации происходит связывание испытуемого анатоксина с антитоксином в эквивалентном соотношении. Содержание антитоксина, не связавшегося с анатоксином, определяют по его токсиннейтрализующей способности. С этой целью в каждый флакон вносят 1,5 мл соответствующего токсина, содержащего 5

опытных доз. Смеси инкубируют при тех же условиях и вводят внутривенно по 0,7 мл группам мышей (не менее 4 животных в каждой).

Испытания проводят совместно с контролем опытной дозы токсина. С этой целью готовят смесь, состоящую из 1 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, 1 мл раствора антитоксина (0,1 МЕ/мл) и 1,5 мл раствора токсина, содержащего 5 опытных доз. Смеси тщательно перемешивают, инкубируют при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение (45 ± 1) мин и вводят внутривенно по 0,7 мл мышам опытных и контрольной групп.

За животными наблюдают в течение 4 сут, учитывая количество больных и павших в каждой группе. Отмечают разведение анатоксина с наименьшей предполагаемой активностью, вызвавшее у мышей опытной группы такой же эффект, как в контрольной группе. Это означает, что из 0,2 МЕ антитоксина, находившихся в смеси, 0,1 МЕ антитоксина не связалась с анатоксином и вступила в реакцию нейтрализации токсина. Следовательно, 0,1 МЕ антитоксина связала анатоксин, активность которого равна 0,1 ЕС/мл. При определении содержания анатоксина в исходном растворе учитывают его разведение.