

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Определение содержания
антиальфастафилолизина
(специфических антител)
в лекарственных препаратах
из сыворотки крови человека
и животных**

ОФС.1.8.2.0008.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод определения содержания антиальфастафилолизина (специфических антител), предназначенный для оценки специфической активности препаратов крови (донорская плазма, плазма для фракционирования, иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного и внутримышечного введения, иммуноглобулин человека антистафилококковый для внутримышечного введения), иммуногенности анатоксинов стафилококковых (раствора и суспензии) для подкожного введения, а также для определения активности токсина стафилококкового диагностического. С помощью описываемого метода определяют содержание антиальфастафилолизина – специфических антител к экзотоксину стафилококковому (син.: альфа-токсин, токсин стафилококковый, альфастафилолизин).

Метод основан на способности специфических антител нейтрализовать гемолитические свойства стафилококкового альфатоксина.

Используемые ингредиенты:

- 0,9 % раствор натрия хлорида ($\text{pH } 7,2 \pm 0,1$);
- вода очищенная;
- стандартный образец (СО) антиальфастафилолизина;

- эритроциты кролика;
- набор реагентов для определения уровня антиальфастафилолизина в сывороточных препаратах крови человека и животных (токсин стафилококковый диагностический).

Стандартный образец (СО) антиальфастафилолизина представляет собой раствор очищенной концентрированной сыворотки крови лошади в глицерине, полученный путем иммунизации лошадей стафилококковым анатоксином, который содержит антитела к альфастафилолизину. Активность стандартного образца (СО) выражается в Международных единицах (МЕ).

Для того, чтобы исключить искажение результатов испытания специфической активности препаратов, обязательно определяют уровень содержания антиальфастафилолизина в сыворотке крови кроликов-доноров. Пригодными считаются те кролики, в сыворотке крови которых антиальфастафилолизин отсутствует или содержится в количестве не более 0,125 МЕ/мл. Кролик в качестве донора может быть использован в течение 3 – 6 мес.

Кровь берут из сердца или краевой вены уха кролика-донора в стерильный сосуд со стеклянными бусами и дефибринируют её, встряхивая флакон круговыми движениями в течение 10 - 15 мин. Кровь освобождают от сгустка фибрина и бус, в асептических условиях фильтруя ее в стерильный флакон через стерильную марлю, сложенную в три слоя. Дефибринированная кровь пригодна для приготовления взвеси эритроцитов в течение 2 дней при условии хранения её при температуре от 2 до 8°C.

Кровь кролика можно консервировать в равных объемах модифицированного раствора Олсвера.

Примечание.

Приготовление модифицированного раствора Олсвера. В 1200 мл воды очищенной растворяют 24,6 г глюкозы, 9,6 г натрия цитрата, 5,04 г натрия хлорида, доводят рН до 6,1 с помощью 1М раствора лимонной кислоты и стерилизуют текучим паром в течение 30 мин.

Консервированная кровь пригодна для приготовления взвеси эритроцитов в течение 30 дней при условии хранения при температуре от 2 до 8⁰С.

Методика испытания

В день проведения испытания эритроциты кролика из дефибринированной или консервированной крови отмывают трижды пятикратным объемом 0,9 % раствора натрия хлорида и последующего центрифугирования в течение 15 мин при 1500 об/мин.

Из осадка отмытых эритроцитов готовят 15 % суспензию, используя 0,9% раствор натрия хлорида. Для стандартизации методики устанавливают концентрацию эритроцитов в приготовленной взвеси, определяя оптическую плотность гемолизированного раствора эритроцитов. Для этого к 0,5 мл 15 % взвеси эритроцитов кролика добавляют 2,0 мл воды очищенной, перемешивают круговыми движениями, после чего разводят полученный раствор 1:6.

После приготовления раствора гемолизированных эритроцитов измеряют оптическую плотность раствора гемоглобина, полученного в результате гемолиза, при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 1 мм. Контролем служит вода очищенная. Величина оптической плотности приготовленного раствора должна быть равна $0,53 \pm 0,01$.

В случае, если этот показатель выше 0,54, к приготовленной 15 % взвеси эритроцитов добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида в объеме ($V_{доб}$), рассчитанном по формуле:

$$V_{доб} = V_{нач} \cdot A_{400} / 0,53 - V_{нач},$$

где: $V_{нач}$ – начальный объем 15 % взвеси эритроцитов;

A_{400} – значение оптической плотности гемолизированного раствора.

В случае, если значение оптической плотности ниже 0,52, то добавляют отмытые эритроциты в объеме ($V_{эр.доб}$), рассчитанном по формуле:

$$V_{эр.доб} = V_{эр.исх} \cdot 0,53 / A_{400} - V_{эр.исх},$$

где: $V_{\text{эр.исх}}$ – объем отмытых эритроцитов, использованных для приготовления 15% взвеси, мл;

A_{400} – значение оптической плотности гемолизированного раствора.

После добавления 0,9% раствора натрия хлорида или отмытых эритроцитов следует вновь определить оптическую плотность приготовленного раствора. Приготовленная 15% взвесь эритроцитов с установленным значением оптической плотности пригодна для проведения анализа в течение дня.

Токсин стафилококковый диагностический представляет собой фильтрат бульонной культуры токсигенного штамма стафилококка 0-15 и выпускается с установленным значением Lh (лимит гемолитического действия токсина). Лимит гемолитического действия токсина (Lh) – это минимальное количество стафилококкового токсина, соответствующее 1 МЕ (Международной единице) СО антиальфастафилолизина, которое вызывает почти полный гемолиз (+++) взятых в опыт эритроцитов кролика.

В день проведения испытания специфической активности препаратов необходимо установить Lh токсина в условиях опыта, т.к. вследствие влияния различных факторов (нестабильность стафилококкового токсина в процессе хранения, возможные колебания чувствительности отдельных партий эритроцитов кролика и др.) результаты могут отклоняться в ту или иную сторону.

Методика определения лимита гемолитического действия стафилококкового токсина

Разведения токсина готовят, исходя из величины Lh, указанной в паспорте препарата. Осторожно, не касаясь стенок, в 7 пробирок вносят испытуемый токсин: в среднюю – в объеме, равном величине Lh по паспорту, в остальные – в соответствующих объемах с интервалом в 0,01 мл в стороны убывания и возрастания от средней пробирки. Затем в каждую пробирку добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида до объема 1,0 мл.

СО антиальфастафилолизина разводят до содержания 1 МЕ

антиальфастафилолизина в 1,0 мл и добавляют по 1,0 мл приготовленных разведений токсина в каждую пробирку с СО. В контрольную пробирку (контроль отсутствия спонтанного лизиса эритроцитов кролика) вносят 2,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Пробирки со смесью антигена (стафилококкового токсина) с антителом (СО антиальфастафилолизина) осторожно встряхивают и инкубируют при температуре от 18 до 22 °С в течение 15 мин. Затем в каждую пробирку ряда (опытные и контрольную) добавляют по 0,1 мл свежеприготовленной 15 % взвеси эритроцитов с установленной величиной оптической плотности. Пробирки снова осторожно встряхивают и инкубируют в термостате при температуре $(37,0 \pm 0,5)$ °С в течение 1 ч.

Результаты учитывают визуально по степени гемолиза:

- (++++) – полный гемолиз эритроцитов;
- (+++) – почти полный гемолиз эритроцитов;
- (++) – частичный гемолиз (50 % гемолиз эритроцитов);
- (+) – следы гемолиза эритроцитов;
- (-) – отсутствие гемолиза эритроцитов.

В контрольной пробирке гемолиз эритроцитов должен отсутствовать.

Количество токсина, содержащееся в первой пробирке, в которой произошел почти полный гемолиз (+++) эритроцитов, принимается за лимит его гемолитического действия в условиях опыта.

Методика определения содержания антиальфастафилолизина в испытуемых образцах в концентрации 0,2 МЕ/мл и выше

Стафилококковый токсин с установленной величиной Lh непосредственно перед проведением анализа разводят 0,9 % раствором натрия хлорида до содержания Lh/5 в 1,0 мл (рабочий раствор токсина). Количество исходного токсина и объем рабочего раствора стафилококкового токсина, необходимый для проведения анализа, рассчитывают, исходя из установленной величины Lh токсина и количества пробирок, необходимых для проведения анализа.

Для определения концентрации антиальфастафилолизина в 1 мл

испытуемого сывороточного препарата готовят его разведения с учетом предполагаемого содержания антиальфастафилолизина (в МЕ/мл) по схеме (табл. 1).

Таблица 1 - Схема разведения исследуемых препаратов

№ пробирки	Предполагаемое содержание антиальфастафилолизина, (МЕ/мл)	Разведение препарата	Количество вносимого в пробирку	
			исследуемого препарата, мл	0,9% раствора натрия хлорида, мл
1	0,2	-	0,5	-
2	0,5	1:2,5	1,0	1,5
3	1	1:5	1,0	4,0
4	2	1:10	1,0	9,0
5	3	1:15	0,5 (из пробирки № 3)	1,0
6	4	1:20	0,5 (из пробирки № 3)	1,5
7	5	1:25	0,5 (из пробирки № 3)	2,0
8	6	1:30	0,5 (из пробирки № 3)	2,5
9	7	1:35	0,5 (из пробирки № 3)	3,0
10	8	1:40	0,5 (из пробирки № 3)	3,5
11	9	1:45	0,5 (из пробирки № 3)	4,0
12	10	1:50	0,5 (из пробирки № 3)	4,5
13	14	1:70	0,5 (из пробирки № 4)	3,0
14	16	1:80	0,5 (из пробирки № 4)	3,5
15	18	1:90	0,5 (из пробирки № 4)	4,0
16	20	1:100	0,5 (из пробирки № 4)	4,5
17	22	1:110	0,5 (из пробирки № 4)	5,0
18	24	1:120	0,5 (из пробирки № 4)	5,5
19	26	1:130	0,5 (из пробирки № 4)	6,0
20	28	1:140	0,5 (из пробирки № 4)	6,5 и т.д

Каждый опыт сопровождается контролем, необходимым для подтверждения соблюдения условий проведения испытания. Контроль предусматривает оценку точности взятой в опыт дозы стафилококкового токсина и, при необходимости, коррекцию результатов опыта с помощью СО антиальфастафилолизина.

СО антиальфастафилолизина разводят 0,9 % раствором натрия хлорида

до содержания 1 МЕ антиальфастафилолизина в 1 мл. Далее из этого разведения, содержащего 1 МЕ/мл, готовят следующие разведения по схеме (табл.2).

Таблица 2 – Схема разведения СО антиальфастафилолизина

№ пробирки	Концентрация СО антиальфастафилолизина, МЕ/0,5 мл	Количество вносимого в пробирку	
		СО антиальфа-стафилолизина в разведении 1 МЕ/мл, мл	0,9% раствора натрия хлорида, мл
1	0,12	1,0	3,17
2	0,11	1,0	3,55
3	0,10	1,0	4,00
4	0,09	1,0	4,56
5	0,08	1,0	5,25

В чистые пробирки вносят по 0,5 мл необходимых для анализа разведений испытуемого препарата (опытный ряд) и по 0,5 мл приготовленных разведений СО антиальфастафилолизина (контрольный ряд), затем в каждую пробирку вносят по 0,5 мл приготовленного разведения стафилококкового токсина (рабочего раствора токсина). Пробирки осторожно встряхивают круговыми движениями и инкубируют при температуре от 18 до 22 °С в течение 15 мин.

Затем в каждую пробирку опытного и контрольного рядов добавляют по 0,05 мл свежеприготовленной 15% взвеси эритроцитов кролика с установленной величиной оптической плотности. Пробирки вновь осторожно встряхивают круговыми движениями и инкубируют при температуре (37,0±0,5) °С в течение 1 ч.

После инкубации проводят учет результатов реакции по степени выраженности гемолиза.

Учет результатов начинают с визуальной оценки степени гемолиза. Для этого в контрольном и опытном рядах отбирают последнюю пробирку, в которой отмечается начало гемолиза (+), все пробирки с 50 % (частичным)

гемолизом (++) и первую пробирку с почти полным гемолизом (+++). Для остановки гемолиза отобранные пробирки помещают в холодильник на 10 минут при температуре 2 - 8 °С. После охлаждения пробирки центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость из каждой пробирки быстро и осторожно отбирают в чистые сухие пробирки и определяют оптическую плотность при длине волны 400 нм, используя кюветы с толщиной слоя 1 мм. Раствором сравнения служит 0,9 % раствор натрия хлорида. Оптическая плотность, соответствующая 50 % гемолизу эритроцитов, должна быть равна $0,35 \pm 0,05$.

Аналогичным образом определяют оптическую плотность надосадочной жидкости в пробирках контрольного ряда, содержащих разведения СО антиальфастафилолизина. При оптимальных условиях опыта 50 % гемолиз эритроцитов и величина оптической плотности, равная $0,35 \pm 0,05$, регистрируются в пробирке, содержащей 0,1 МЕ СО антиальфастафилолизина, т.е. расчетная доза Лh/10 точно соответствует её истинному значению. В этом случае пробирка опытного ряда, в которой зарегистрирован гемолиз 50 % эритроцитов, содержит 0,1 МЕ антиальфастафилолизина в объеме 0,5 мл, что соответствует содержанию 0,2 МЕ в мл. Для расчета содержания антиальфастафилолизина в 1,0 мл неразведенного исследуемого образца, необходимо 0,2 МЕ умножить на величину разведения в данной пробирке. Например, первая пробирка, в которой надосадочная жидкость имеет величину оптической плотности $0,35 \pm 0,05$, содержит препарат в разведении 1:100; следовательно, 1 мл неразведенного препарата содержит $0,2 \text{ МЕ} \cdot 100 = 20 \text{ МЕ}$.

В результате влияния различных факторов возможно несоответствие дозы токсина, используемой в опыте, получаемому расчетному значению. В таких случаях при расчете специфической активности испытуемых препаратов применяется коэффициент пересчета (К), определяемый для каждого конкретного анализа по формуле:

$$K = a/0,1,$$

где: а – концентрация (количество МЕ) СО антиальфастафилолизина в первой пробирке контрольного ряда, в которой зарегистрирован гемолиз 50 % эритроцитов, дающий оптическую плотность надосадочной жидкости $0,35 \pm 0,05$.

Методика определения содержания антиальфастафилолизина в испытуемых сывороточных образцах в концентрации не более 0,125 МЕ/мл

Для исключения искажения результатов при определении специфической активности иммуноглобулинов и препаратов крови, необходимо определять содержание антиальфастафилолизина в сыворотке крови кроликов, используемых в качестве доноров для получения эритроцитов, а также при подборе кроликов для проведения испытания иммуногенности (специфической активности), специфической безвредности и антигенной активности стафилококковых анатоксинов. Для таких целей пригодны кролики, в сыворотке крови которых антиальфастафилолизин отсутствует или содержится в количестве не более 0,125 МЕ/мл.

Для определения малых концентраций антиальфастафилолизина можно использовать метод титрования препарата с использованием более высоких разведений токсина (Lh/20, Lh/40, Lh/80, и т.д.).

Определение содержания антиальфастафилолизина в сыворотках крови кроликов проводят следующим образом: испытуемые сыворотки разводят в 5 раз 0,9% раствором натрия хлорида. Для этого в пробирку с 4,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида добавляют 1,0 мл сыворотки. Затем в необходимых количествах готовят разведения стафилококкового токсина с содержанием в 0,5 мл Lh/40 и Lh/80. Для приготовления разведений токсина используют токсин с точно установленной в день испытания величиной Lh.

Разведенную в 5 раз сыворотку разливают по 0,5 мл в 3 пробирки, затем в первую и вторую добавляют по 0,5 мл токсина в разведениях Lh/40 и Lh/80 соответственно, а в третью, являющуюся контрольной, вносят 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Для контроля наличия литического действия токсина берут еще 2 пустые пробирки и наливают в них по 0,5 мл каждого

приготовленного разведения токсина и по 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Пробирки осторожно встряхивают, оставляют при температуре 18 - 22 °С в течение 15 мин, а затем во все пробирки добавляют 0,05 мл свежеприготовленной в день испытания 15 % взвеси эритроцитов кролика-донора. Пробирки вновь осторожно встряхивают и инкубируют при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 1 ч. Результаты учитывают визуально по степени гемолиза эритроцитов (табл.3). В контрольной пробирке № 3 (без добавления токсина) гемолиз эритроцитов должен отсутствовать; в контрольных пробирках с соответствующими разведениями токсина должен произойти полный гемолиз эритроцитов.

Таблица 3 - Примеры оценки результатов опыта

№ кролика (сыворотки)	Степень гемолиза в пробирках			Оценка результатов (количество МЕ/мл сыворотки)	Вывод
	Lh/40	Lh/80	Контроль сывороток		
1	++++	+++	–	< 0,125 МЕ	Годеен
2	++++	++	–	0,125 МЕ	Возможно годеен
3	+++	+ (–)	–	> 0,125 < 0,25 МЕ	Не годеен
4	++	–	–	0,25 МЕ	Не годеен
5	+ (–)	–	–	> 0,25 МЕ	Не годеен
Контроль токсина	++++	++++			

Результаты следует считать относительно точными, поскольку опыт не сопровождается контролем с СО антиальфастафилолизина. Необходимость включения в опыт контрольного ряда СО в данном случае не оправдана, принимая во внимание цели испытания и концентрацию антиальфастафилолизина. При необходимости точного определения малых концентраций антиальфастафилолизина следует использовать методику, описанную выше, но использовать более высокие разведения токсина.