

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Иммуногенность адсорбированного
дифтерийного анатоксина**

**ОФС.1.7.2.0003.15
Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья предназначена для определения специфической (иммуногенной) активности адсорбированного дифтерийного анатоксина, входящего в состав комбинированных вакцин. Специфическую активность дифтерийного анатоксина определяют по его способности защищать иммунизированных животных от заражения дифтерийным токсином и выражают в количестве Международных единиц (МЕ) активности, содержащихся в 1 мл или в прививочной дозе (0,5 мл). Специфическую активность дифтерийного 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 дифтерийным токсином (LD₅₀). Для определения специфической активности используют метод множественных разведений. При стабильно воспроизводимых показателях специфической активности адсорбированного дифтерийного анатоксина и стандартной технологии производства возможно использование метода с одним разведением.

Метод множественных разведений

Разными дозами вакцины иммунизируют не менее 3 групп по 10 морских свинок в каждой группе. Не менее 3 аналогичных групп животных иммунизируют разными дозами референс-препарата, калиброванного в МЕ. Разведения вакцины и референс-препарата 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 - 30 сут иммунизированным животным вводят по 100 LD₅₀ дифтерийного токсина. Наблюдение проводят в течение 5 сут, регистрируя число выживших животных в каждой группе, и рассчитывают для вакцины и референс-препарата величины ED₅₀ (статистически определяемая доза вакцины или референс-препарата, защищающая от гибели 50% иммунизированных животных в течение 4 сут). На основании полученных результатов определяют количество МЕ в 1 мл вакцины.

Материалы и животные:

- референс-препарат (стандартный образец активности адсорбированного дифтерийного анатоксина, калиброванный в МЕ по соответствующему международному стандартному образцу);
- испытуемая вакцина;
- дифтерийный токсин с предварительно установленной дозой LD₅₀ (статистически определяемая доза токсина, вызывающая гибель 50 % животных в течение 4 сут);
- морские свинки массой 250 – 350 г обоего пола.

Примечания.

1. Приготовление разведений референс-препарата. Референс-препарат разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида (рН 7,0 ± 0,2) и готовят не менее 3 последовательных разведений с двойным шагом (например: 1, 2 и 4 МЕ/мл).

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

Иммунизация животных

Разведения референс-препарата и вакцины вводят морским свинкам по 1 мл подкожно в бок.

Введение дифтерийного токсина

По истечении 28 сут всем иммунизированным животным вводят подкожно в область грудины 1 мл дифтерийного токсина, содержащего 100 LD₅₀. Опыт сопровождают контролем величины LD₅₀ дифтерийного токсина. Для этого неиммунизированным морским свинкам из той же партии, разделенным на 3 группы (не менее 5 свинок в каждой группе), вводят дифтерийный токсин в дозах 0,5, 1 и 2 LD₅₀. За иммунизированными животными и животными контрольной группы наблюдают 4 сут, регистрируя число выживших в каждой группе.

На основании полученных результатов производят расчет иммуногенной активности дифтерийного анатоксина с помощью статистических программ, включающих *Probit analysis*, или по формуле Кербера, определяя величины ED₅₀ для референс-препарата (в МЕ) и испытуемой вакцины (в мл).

Формула Кербера:

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

где D_N – величина максимальной из испытанных доз;

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

L_i – отношение количества выживших животных к общему числу животных, получивших данную дозу;

ΣL_i – сумма значений L_i, найденных для всех испытуемых доз.

LD₅₀ токсина рассчитывают по той же формуле, в которой

L_i – отношение количества павших к общему числу животных, получивших данную дозу токсина.

Испытание считается проведенным правильно, если:

- вычисленные значения ED_{50} для вакцины и референс-препарата находятся 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 введенного дифтерийного токсина приблизительно равна 100 LD_{50} .

Метод с одним разведением

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

По результатам ранее проведенных испытаний с 3 разведениями выбирают дозу референс-препарата, обеспечивающую выживаемость 10–20 % иммунизированных животных при заражении разрешающей дозой токсина. Разведение вакцины осуществляют 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 1 мл. Через 28 сут всем иммунизированным животным вводят разрешающую дозу дифтерийного токсина, равную 100 LD_{50} , в объеме 1 мл. Опыт сопровождают контролем величины LD_{50} дифтерийного токсина. За животными наблюдают 4 сут, регистрируя число выживших в каждой группе. Результаты выражают как

отношение числа выживших к общему числу морских свинок в группе, иммунизированных вакциной или референс-препаратом. 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 дифтерийного анатоксина при испытании методом с одним разведением не соответствует требованиям нормативной документации, испытание повторяют методом множественных разведений.