

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Определение содержания

ОФС.1.7.2.0007.15

анатоксинов/токсинов

в реакции флоккуляции

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на реакцию флоккуляции, которая предназначена для определения содержания анатоксинов или токсинов в растворах.

Реакция флоккуляции по Рамону (Ramon assay) основана на способности некоторых антигенов при соединении со специфическими антителами образовывать нерастворимый комплекс «антиген–антитело», который визуалью выявляется в виде помутнения среды и образования хлопьев (флоккулята). Характерной особенностью реакции флоккуляции является феномен инициальной флоккуляции, т.е. способность формирования флокулята в первую очередь в тех растворах, где содержание антигена и антител (токсина/анатоксина-антитоксина) эквивалентны.

Для проведения испытания используют специфический антитоксин, калиброванный, в зависимости от использованного иммунохимического метода, в Международных единицах (МЕ) или Lf-эквивалентах (Lf-eq.). Предпочтительнее использовать антитоксины, калиброванные в единицах Lf-eq. против соответствующих международных референс-препаратов анатоксинов для флоккуляционных тестов. За 1 Lf принимают количество анатоксина, которое вступает в реакцию флоккуляции с 1 МЕ или 1 Lf-eq. антитоксина в наиболее короткий промежуток времени. Содержание токсина/анатоксина в растворе, определенное в реакции флоккуляции, выражают в Lf/мл.

ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ

Специфический антитоксин в концентрации 100 МЕ или Lf-eq. в 1 мл вносят в возрастающих объемах (количествах МЕ/мл) в ряд пробирок, содержащих равные объемы испытуемого раствора токсина/анатоксина. Содержимое каждой пробирки доводят до равного объема 0,9 % раствором натрия хлорида. Смеси перемешивают, избегая образования пены. Пробирки со смесями инкубируют на водяной бане при температуре 45–50 °С, периодически оценивая состояние растворов.

Результат реакции оценивают в проходящем свете, при необходимости применяют лупу. Отмечают пробирки, в которых раньше других произошла флоруляция, и время наступления флоруляции (Kf). Пробирка, в которой раньше других наблюдается появление хлопьев (инициальная флоруляция), содержит эквивалентные или близкие к эквивалентным количества антигена и антител. Для расчета содержания антигена учитывают концентрацию антитоксина в этой пробирке. Если инициальная флоруляция наблюдается одновременно в 2 пробирках, для расчета берут среднее значение показателей концентрации антитоксина, содержащегося в этих пробирках. Если перед проведением реакции флоруляции испытуемый раствор был разведен, то для расчета содержания анатоксина в растворе полученный результат умножают на степень разведения.

Показатель (Kf) является полезным индикатором качества антигена. Если при данных значениях температуры и концентраций анатоксина и антитоксина значение Kf при повторных испытаниях увеличивается по сравнению с наблюдавшимся ранее, это может свидетельствовать о разрушении антигена и снижении его иммуногенной активности.

Определение содержания анатоксина в испытуемом образце представлено в табл.

Таблица – Определение содержания анатоксина в испытуемом образце

Испытуемый раствор	№ пробирки				
	1	2	3	4	5
Объем раствора испытуемого анатоксина, мл	1	1	1	1	1
Объем внесенного раствора соответствующего антитоксина, мл	0,35	0,40	0,45	0,50	0,55
Активность внесенного антитоксина, МЕ/мл	35	40	45	50	55
Объем внесенного раствора 0,9 % натрия хлорида, мл	0,65	0,60	0,55	0,50	0,45

В данном примере раньше других наблюдалась флокуляция в пробирке № 3, следовательно, в этой пробирке содержание анатоксина близко или эквивалентно количеству внесенного антитоксина. В данном случае – 45 Лf/мл. Если испытуемый раствор был разведен в 10 раз, содержание анатоксина в нем равно 450 (45·10) Лf/мл. Если инициальная флокуляция произошла в пробирке № 1 или № 5, результаты не учитывают, а тест повторяют, изменив количество вносимого антитоксина или разведение испытуемого раствора токсина/анатоксина. Для выполнения повторной реакции объемы вносимого в пробирки антитоксина следует выбирать с учетом того, чтобы крайняя пробирка (№ 1 или № 5), в которой наблюдалась инициальная флокуляция, оказалась в середине ряда.

Для получения более точных результатов повторяют тест, выполняя реакцию флокуляции с объемами вносимого антитоксина, близкими по значению к эквивалентной концентрации, используя меньшие различия во вносимых объемах. Например: если инициальная флокуляция произошла в пробирке № 3, следует для уточнения эквивалентной концентрации повторить реакцию, внося в пробирки ряда антитоксин в объемах 0,41; 0,43; 0,45; 0,47; 0,49 мл.

Для подтверждения полученных результатов тест повторяют при тех же условиях. Результаты считаются приемлемыми, если в повторных тестах наблюдаются различия не более чем на 1 разведение антитоксина. За окончательное значение принимают среднее арифметическое повторных измерений.

Реакция флоккуляции для растворов с низкой концентрацией анатоксинов/токсинов

Для растворов анатоксинов или токсинов с низкой концентрацией (менее 5 Lf/мл) предпочтительнее использовать метод смешанной флоккуляции, поскольку Lf смеси анатоксинов равен сумме их Lf (при условии их гомогенности). Метод заключается в сравнении значений Lf раствора анатоксина с предварительно установленной концентрацией с Lf этого же анатоксина в смеси с испытуемым анатоксином низкой концентрации.

Если токсины/анатоксины не гомогенны, может возникать ложная картина с 2 флоккуляционными максимумами. Например: анатоксин с известным содержанием разводят 0,9 % раствором натрия хлорида в соотношении 1:1. Тот же анатоксин смешивают с раствором испытуемого анатоксина низкой концентрации в равных соотношениях. Каждую из смесей разливают по 1 мл в ряд пробирок. В пробирки обоих рядов вносят в возрастающих объемах антитоксин с концентрацией 100 ME/мл и 0,9 % раствор натрия хлорида для доведения общего объема в каждой из пробирок до постоянной величины. Инкубируют пробирки на водяной бане при температуре 45 – 50 °С, периодически оценивая состояние раствора. Отмечают пробирки с инициальной флоккуляцией в каждом ряду. Разница значений показателей инициальной флоккуляции обоих рядов указывает на содержание анатоксина в испытуемом растворе.