2.1.11.35. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАКЦИНЫ (АНАТОКСИНА) ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ СТОЛБНЯКА АДСОРБИРОВАННОЙ

Общая фармакопейная статья распространяется на методы определения активности вакцины (анатоксина) для профилактики столбняка адсорбированной. Методы основаны на определении защитного действия вакцины (анатоксина) от инфицирования столбнячным токсином иммунизированных животных (морских свинок или мышей) (методы 1 или 2) или на определении титра антител против столбнячного анатоксина в сыворотке крови иммунизированных морских свинок (метод 3). Активность вакцины (анатоксина) оценивают путем сравнения активности испытуемого образца с такой же активностью стандартного образца, калиброванного в международных единицах.

Для методов 1 и 2 действие вакцины (анатоксина) может быть определено по степени защиты от паралича (метод паралича) или по оценке LD_{50} (метод летального инфицирования). Для метода с оценкой LD_{50} количество животных и методика аналогичны таковым для метода паралича, но конечной точкой является смерть животного, а не паралич.

За международную единицу принимают активность анатоксина против столбняка в определенном количестве международного стандартного образца, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения. Международный стандартный образец представляет собой анатоксин против столбняка адсорбированный.

В качестве стандартного образца может быть использован *СО ФЕАЭС вакцины (анатоксина) для профилактики столбняка адсорбированной*, калиброванный в международных единицах.

Выбор метода зависит от цели испытаний. Методы 1 или 2 применяют:

1) в процессе разработки вакцины (анатоксина) и при валидации производственного процесса;

2) при ревалидации (при значительных изменениях производственного процесса), если необходимо

3) для контроля качества при выпуске вакцины (анатоксина), однако предпочтительно, если применимо, использовать метод 3 в интересах защиты животных.

Метод 3 применяют для контроля качества лекарственного препарата и в других случаях, за исключением описанных в пунктах 1 и 2, после валидации для конкретного лекарственного препарата. Для данной цели подходящее количество серий (обычно три серии) испытывают методом 3 и методом 1 или 2.

Если различные вакцины или анатоксины (моновалентные или комбинированные) приготовлены из анатоксина для профилактики столбняка одного и того же происхождения, содержащего сопоставимые уровни анатоксина в Lf/мл, то валидация методики, проведенная для вакцины (анатоксина) с максимальным количеством компонентов, может распространяться на комбинированные вакцины (анатоксины) с меньшим числом компонентов и на моновалентную вакцину (анатоксин).

Метод испытаний анатоксина для профилактики столбняка в составе комбинированных лекарственных препаратов, содержащих в одном флаконе также вакцину для профилактики коклюша цельноклеточную или вакцину против *Haemophilus B,* конъюгированную с анатоксином для профилактики столбняка, должен быть обоснован и валидирован для конкретного препарата.

Для комбинированных вакцин (анатоксинов), содержащих анатоксин для профилактики столбняка и анатоксин для профилактики дифтерии, испытания методом 3 могут быть выполнены на той же группе животных, которую использовали для количественного определения вакцины (анатоксина) для профилактики дифтерии

адсорбированной, при соблюдении общих условий иммунизации для столбнячного и дифтерийного компонентов (например, доза, продолжительность).

В испытаниях, представленных ниже, используют многократные разведения испытуемого образца и стандартного образца. При стабильном получении воспроизводимых результатов определения активности вакцины (анатоксина) для профилактики столбняка адсорбированной возможен переход на испытание по упрощенной схеме с использованием одного разведения как испытуемого образца, так и стандартного образца. Применение упрощенной схемы испытания позволяет определить значительное превышение минимально допустимых значений активности испытуемого образца, но не дает информации о линейности, параллельности и других параметрах зависимости «доза – ответ». Испытание по упрощенной схеме позволяет сократить количество используемых животных.

Если проводят испытания с одним разведением, последовательность производственных процессов и испытания в динамике контролируют с использованием подходящих индикаторов, а также проведением испытания с множественными разведениями с определенной периодичностью, например, каждые два года. Для метода 3 подходящими индикаторами являются:

– средние значения и стандартные отклонения относительных титров антител (антитоксина) в образцах сывороток, полученных после введения определенных доз стандартного образца вакцины (анатоксина);

– титры антител (антитоксинов) в положительных или отрицательных контрольных сыворотках;

– соотношение титров антител (антитоксина) в положительной контрольной сыворотке и в сыворотке, полученной после введения стандартного образца вакцины (анатоксина).

МЕТОД 1. ИСПЫТАНИЕ НА МОРСКИХ СВИНКАХ

ВЫБОР И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

В испытании используют здоровых морских свинок из одной партии (стока), весом 250-350 г. Животных распределяют не менее чем на шесть групп (опытные группы), содержащих количество особей, достаточное для получения достоверных результатов. Все морские свинки в испытании должны быть одного пола, либо самцы и самки должны быть распределены поровну между группами.

При необходимости определения активности токсина, используемого для инфицирования, дополнительно используют три группы из пяти неиммунизированных животных каждая (контрольные группы).

ВЫБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАЗВЕДЕНИЙ СТОЛБНЯЧНОГО ТОКСИНА

Используют столбнячный токсин, содержащий в 1,0 мл не менее 50 доз, вызывающих паралич 50 % животных. Если стабильность токсина предварительно подтверждена, нет необходимости определять его активность для каждого испытания.

Токсин разводят непосредственно перед использованием подходящим растворителем (например, раствором 9 г/л *натрия хлорида Р*, значение pH которого доводят до 7,4 раствором пептона) до содержания около 50 доз, вызывающих паралич у 50 % животных, в 1,0 мл. При необходимости определения активности токсина, из полученного разведения готовят дополнительные разведения 1:16, 1:50 и 1:160 с использованием того же растворителя.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ

Готовят серию разведений испытуемого образца и аналогичную серию разведений стандартного образца в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р* так, чтобы разведения отличались

друг от друга не более чем в 2,5 раза, а подкожное введение промежуточных разведений по 1,0 мл морским свинкам защищало около 50 % животных от паралитического действия определенного количества столбнячного токсина, введенного внутрикожно.

Распределяют разведения по одному на каждую опытную группу морских свинок и вводят подкожно каждому животному по 1,0 мл разведения, предназначенного для данной группы. Через 28 сут каждой морской свинке вводят подкожно по 1,0 мл раствора токсина, содержащего в 1,0 мл около 50 доз, вызывающих паралич у 50 % животных.

При необходимости определения активности токсина, распределяют три разведения токсина на каждую из контрольных групп морских свинок, и вводят подкожно каждому животному в группе по 1,0 мл соответствующего разведения, предназначенного для данной группы. Активность токсина (50-процентную паралитическую дозу) определяют в подходящем количестве испытаний. Если активность и стабильность токсина подтверждена предварительно, нет необходимости определять его активность для каждого испытания.

Дважды в день осматривают морских свинок и усыпляют животных с явными признаками столбнячного паралича. Через пять суток после введения токсина считают количество животных без признаков столбнячного паралича. Активность испытуемого образца по отношению к активности стандартного образца рассчитывают на основании доли животных без паралича в каждой опытной группе морских свинок с использованием общепринятых статистических методов (например, *2.3.12.0.*).

Результаты испытания являются достоверными, если:

- вычисленные значения PD_{50} для испытуемого образца и стандартного образца находятся между значениями наибольшей и наименьшей доз, введенных животным;

- при определении активности токсина количество морских свинок с параличом в трех контрольных группах после введения разведений токсина, указывает на то, что доза введенного столбнячного токсина приблизительно равна 50 дозам, вызывающих паралич у 50 % животных;

- пределы доверительного интервала (P = 0,95) не менее 50 % и не более 200 % от заявленной активности;

- статистический анализ подтверждает отсутствие значимых отклонений в линейности и параллельности кривых «доза – ответ».

Испытание может быть проведено повторно, однако, в случае проведения более одного испытания, достоверные результаты всех испытаний должны быть объединены для определения активности.

МЕТОД 2. ИСПЫТАНИЕ НА МЫШАХ

ВЫБОР И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

В испытании используют здоровых мышей подходящей линии, в том числе аутбредных, из одной партии (стока) в возрасте около пяти недель. Животных распределяют не менее чем на шесть групп (опытные группы), содержащих количество особей, достаточное для получения достоверных результатов. Все мыши в испытании должны быть одного пола, либо самцы и самки должны быть распределены поровну между группами.

Если токсин, используемый для инфицирования, предварительно не стандартизирован или не установлена стабильность его свойств, формируют три дополнительные контрольные группы по пять неиммунизированных животных.

ВЫБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАЗВЕДЕНИЙ СТОЛБНЯЧНОГО ТОКСИНА

Используют столбнячный токсин, содержащий в 1,0 мл не менее 100 доз, вызывающих паралич 50 % животных. Если стабильность токсина предварительно подтверждена, нет необходимости определять его активность для каждого испытания.

Токсин разводят непосредственно перед использованием подходящим растворителем (например, раствором 9 г/л *натрия хлорида Р*, значение pH которого доводят до 7,4 раствором пептона) до содержания около 50 доз, вызывающих паралич у 50 % животных, в 0,5 мл. При необходимости определения активности токсина, из полученного разведения готовят дополнительные разведения 1:16, 1:50 и 1:160 с использованием того же растворителя.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ

Готовят серию разведений испытуемого образца и аналогичную серию разведений стандартного образца в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р* так, чтобы разведения отличались друг от друга не более чем в 2,5 раза, а подкожное введение промежуточных разведений по 0,5 мл мышам защищало около 50 % животных от паралитического действия определенного количества столбнячного токсина, введенного подкожно.

Распределяют разведения по одному на каждую опытную группу мышей и вводят подкожно каждому животному по 0,5 мл разведения, предназначенного для данной группы. Через 28 сут каждому животному вводят подкожно по 0,5 мл раствора токсина, содержащего в 1,0 мл около 100 доз, вызывающих паралич у 50 % животных.

При необходимости определения активности токсина, распределяют три разведения токсина на каждую из контрольных групп мышей, и вводят подкожно каждому животному в группе по 0,5 мл соответствующего разведения, предназначенного для данной группы.

Дважды в день осматривают мышей и усыпляют животных с явными признаками столбнячного паралича. Через четверо суток после введения токсина считают количество животных без признаков столбнячного паралича. Активность испытуемого образца по отношению к активности стандартного образца рассчитывают на основании доли животных без паралича в каждой опытной группе мышей с использованием общепринятых статистических методов (например, *2.3.12.0.*).

Результаты испытания являются достоверными, если:

- вычисленные значения PD_{50} для испытуемого образца и стандартного образца находятся между значениями наибольшей и наименьшей доз, введенных животным;
- при определении активности токсина количество мышей с параличом в трех контрольных группах после введения разведений токсина, указывает на то, что доза введенного столбнячного токсина приблизительно равна 50 дозам, вызывающих паралич у 50 % животных;
- пределы доверительного интервала (P = 0,95) не менее 50 % и не более 200 % от заявленной активности;
- статистический анализ подтверждает отсутствие значимых отклонений в линейности и параллельности кривых «доза – ответ».

Испытание может быть проведено повторно, однако, в случае проведения более одного испытания, достоверные результаты всех испытаний должны быть объединены для определения активности.

МЕТОД 3: ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ У МОРСКИХ СВИНОК

ВЫБОР И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

В испытании используют здоровых морских свинок из одной партии (стока) с массой тела 250-350 г. Животных распределяют не менее чем на шесть групп, содержащих количество особей, достаточное для получения достоверных результатов. Все морские свинки в испытании должны быть одного пола, либо самцы и самки должны быть распределены поровну между группами.

Для получения отрицательной контрольной сыворотки используют контрольную группу неиммунизированных животных из той же партии (стока). При стабильно

воспроизводимых показателях можно использовать стандартную отрицательную контрольную сыворотку.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ

В качестве стандартного образца может быть использован *СО ФЕАЭС вакцины (анатоксина) для профилактики столбняка адсорбированной* или серия вакцины (анатоксина) для профилактики столбняка, с доказанной стабильностью и эффективностью в клинических исследованиях или репрезентативная ей серия, калиброванная в международных единицах относительно *СО ФЕАЭС вакцины (анатоксина) для профилактики столбняка адсорбированной* или международного стандартного образца.

Готовят не менее трех разведений испытуемого образца диапазоне от 0,5 МЕ/мл до 16 МЕ/мл и аналогичные разведения стандартного образца в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р* так, чтобы разведения отличались друг от друга в 2,5–5 раз. Используют разведения для иммунизации по возможности не позже 1 ч с момента приготовления.

Распределяют разведения по одному на каждую группу животных и каждой морской свинке вводят подкожно 1,0 мл разведения, предназначенного для данной группы. Через 35–42 сут после иммунизации подходящим методом забирают образцы крови у каждого иммунизированного и неиммунизированного животного и подготавливают образцы сыворотки.

Исключают повторное замораживание/оттаивание образцов сыворотки. Все манипуляции проводят в ламинарном боксе для предотвращения микробной контаминации образцов.

Определяют относительные титры антител или индексы для каждого образца сыворотки с помощью подходящего иммунохимического метода (*2.1.6.15.*). Может быть использован метод на основе иммуноферментного анализа (ИФА) или метод, основанный на ингибировании связывания анатоксина или токсина (*ToBl*).

Активность испытуемого образца в международных единицах относительно стандартного образца рассчитывают с использованием общепринятых статистических методов (например, *2.3.12.0.*).

Результаты испытания являются достоверными, если:

- доверительный интервал (*P*= 0,95) относительной активности составляет не менее 50 % и не более 200 % от заявленной активности;

- статистический анализ подтверждает значимость линейной регрессии и отсутствие отклонений в линейности и параллельности кривых «доза-ответ» (если наблюдаются значительные отклонения, возможно использование альтернативных методов статистического анализа в соответствии с общей фармакопейной статьей *2.3.12.0 Статистическая обработка результатов биологических испытаний лекарственных средств*).

Испытание может быть проведено повторно, однако, в случае проведения более одного испытания достоверные результаты всех испытаний должны быть объединены для определения активности.

Следующий раздел приводится для информации.

МЕТОД 1. ИСПЫТАНИЕ НА МОРСКИХ СВИНКАХ

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Чтобы свести к минимуму страдания животных, рекомендуется отмечать степень паралича по шкале, приведенной ниже. Шкала основана на типичных признаках столбнячного паралича, развивающегося после подкожного введения столбнячного токсина в середину вентральной области, непосредственно за грудиной, при этом кончик иглы должен быть направлен на шею морской свинки. Степень Т3 принимается за

конечную точку; при наличии достаточного опыта вместо нее за конечную точку можно использовать степень Т2. Столбнячный токсин вызывает паралич по крайней мере одной из передних конечностей, который можно распознать на ранней стадии. Степени столбняка у морских свинок характеризуются следующими признаками:

–Т1: трудно различимая легкая скованность одной передней лапы;

–Т2: парез одной передней лапы, при сохранении её функции;

–Т3: паралич одной передней лапы. Животное двигается с трудом, тело часто слегка скрючено из-за сколиоза;

–Т4: передние конечности полностью неподвижны, пальцы неподвижны. Мышечное сокращение передних конечностей очень выражено, обычно наблюдается сколиоз;

–Т5: судороги, непрерывный тонический спазм мышц;

–D: смерть.

МЕТОД 2. ИСПЫТАНИЕ НА МЫШАХ

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Чтобы свести к минимуму страдания животных, рекомендуется отмечать степень паралича по шкале, указанной показанной ниже. Шкала основана на типичных признаках столбнячного паралича, развивающегося после подкожного введения столбнячного токсина в область спины, рядом с одной из задних лап. Степень Т3 принимается за конечную точку; при наличии достаточного опыта вместо нее за конечную точку можно использовать степень Т2. Столбнячный токсин вызывает парез задних конечностей, за которым следует паралич, хорошо различимый на ранней стадии. Степени столбняка у мышей характеризуются следующими признаками:

–Т1: наблюдается легкая ригидность задней лапы, возле которой был введен токсин (различима, когда мышь поднимают за хвост);

–Т2: парез задней лапы, возле которой был введен токсин, лапа всё ещё может функционировать при ходьбе;

–Т3: паралич задней лапы, возле которой был введен токсин, лапа не функционирует;

–Т4: задняя лапа, возле которой был введен токсин, полностью неподвижна, с неподвижными пальцами;

–Т5: столбнячные припадки, непрерывный тонический спазм мышц;

–D: смерть.

МЕТОД 3: ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ У МОРСКИХ СВИНОК

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ СЫВОРОТКИ

Для приготовления образца сыворотки применяют следующую методику: переворачивают пробирку с образцом крови шесть раз и выдерживают при температуре 37 °C в течение двух часов, затем при температуре 4 °C в течение двух часов, центрифугируют при комнатной температуре при 800 g в течение 20 мин. Сыворотку переносят в стерильные пробирки и хранят при температуре ниже −20 °C. Данная методика позволяет получить не менее 40 % сыворотки из образца крови.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ МОРСКОЙ СВИНКИ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

В лунки планшета для ИФА с адсорбированным столбнячным анатоксином вносят разведения сывороток животных, иммунизированных испытуемым образцом (испытуемая сыворотка) и стандартным образцом. Положительную и отрицательную контрольные сыворотки морской свинки включают в каждую постановку для контроля работы системы. Далее добавляют конъюгированные с пероксидазой антитела кролика или козы

против иммуноглобулина G морской свинки, после чего вносят субстрат. Измеряют оптическую плотность (*2.1.2.24*) и рассчитывают относительный титр антител с использованием общепринятых статистических методов (например, *2.3.12.0*.)

Реактивы и материалы

- планшеты для ИФА 96-луночные;

– стандартный образец противостобнячной антисыворотки морской свинки (положительная контрольная сыворотка), В качестве стандартного образца может быть использован *СО ФЕАЭС противостобнячной антисыворотки морской свинки*;

– конъюгат пероксидазы: конъюгированные с пероксидазой кроличьи или козьи антитела против IgG морской свинки;

– столбнячный анатоксин;

– карбонатный буферный раствор с pH 9,6 для сорбции антигена. Растворяют 1,59 г *натрия карбоната безводного Р* и 2,93 г *натрия гидрокарбоната Р* в 1000 мл *воды Р*. Разливают по 150 мл и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин;

– фосфатно-солевой буферный раствор с pH 7,4. Растворяют 80,0 г *натрия хлорида Р*, 2,0 г *калия дигидрофосфата Р*, 14,3 г *динатрия гидрофосфата дигидрата Р* и 2,0 г *калия хлорида Р* в 1000 мл *воды Р*. Хранят при комнатной температуре для предотвращения кристаллизации. Перед использованием разводят в 10 раз *водой Р*;

– лимонной кислоты раствор. Растворяют 10,51 г *лимонной кислоты Р* в 1000 мл *воды Р* и доводят pH до значения 4,0 раствором 400 г/л *натрия гидроксида Р*;

– промывочный буферный раствор: фосфатно-солевой буферный раствор с pH 7,4, содержащий 0,5 г/л *полисорбата 20 Р*;

– блокирующий буферный раствор: фосфатно-солевой буферный раствор с pH 7,4, содержащий 0,5 г/л *полисорбата 20 Р* и 25 г/л высушенного обезжиренного молока;

– субстратный раствор. Незадолго до использования 10 мг *диаммоний 2,2-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) Р* (ABTS) растворяют в 20 мл *лимонной кислоты раствора Р.* Немедленно перед использованием прибавляют 5 мкл *водорода пероксида раствора концентрированного Р.*

Методика

Для отрицательной контрольной сыворотки используют лунки колонки 1 (от А до Н), лунки колонки 2 (от А до Н) и колонки 12 (от А до Н) – для положительной контрольной сыворотки. Лунки колонок с 3 по 11 (от А до Н) используют для образцов испытуемой сыворотки.

Помещают в лунки планшета для ИФА по 100 мкл раствора столбнячного анатоксина (0,5 Lf/мл в карбонатном буферном растворе с pH 9,6 для сорбции антигена). Планшет оставляют на ночь при температуре 4°°С во влажной камере. Не следует складывать в стопку больше четырех планшетов, чтобы избежать эффекта температурного градиента.

На следующий день планшеты тщательно отмывают промывочным буферным раствором. В каждую лунку планшета прибавляют по 100 мкл блокирующего буферного раствора. Инкубируют во влажной камере при температуре 37 °С в течение одного часа. Отмывают планшеты промывочным буферным раствором.

Вносят по 100 мкл блокирующего буферного раствора во все лунки за исключением ряда А. Готовят подходящие разведения отрицательной и положительной контрольных сывороток (приблизительно от 0,01 МЕ/мл) и испытуемых сывороток. Располагают сыворотки в соответствии со схемой: отрицательную контрольную сыворотку для колонки 1, положительную контрольную сыворотку для колонок 2 и 12 и испытуемые сыворотки для колонок с 3 по 11, и прибавляют по 100 мкл из каждой сыворотки в первые две лунки соответствующих рядов. Используя многоканальную микропипетку, делают двойные последовательные разведения от ряда В к ряду Н, перенося по 100 мкл из одной лунки в следующую. Удаляют 100 мкл из лунок последнего

ряда так, чтобы все лунки содержали по 100 мл. Инкубируют при температуре 37°ºС в течение двух часов. Отмывают промывочным буферным раствором.

Готовят подходящее разведение (например, 2000-кратное) конъюгата пероксидазы в блокирующем буферном растворе и прибавляют по 100 мкл в каждую лунку. Инкубируют при температуре 37°ºС во влажной камере в течение 1 ч. Отмывают планшет промывочным буферным раствором.

Прибавляют по 100 мкл субстратного раствора в каждую лунку. Инкубируют при комнатной температуре в в защищенном от света месте в течение 30 мин.

Измеряют оптическую плотность (*2.1.2.24*) на подходящем спектрофотометре при длине волны 405 нм в том же порядке, как прибавляли субстрат.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ МОРСКОЙ СВИНКИ МЕТОДОМ ИНГИБИРОВАНИЯ СВЯЗЫВАНИЯ ТОКСИНА ИЛИ АНАТОКСИНА (ToBI)

Столбнячный токсин или анатоксин прибавляют к серии разведений испытуемой сыворотки и к серии разведений положительной контрольной сыворотки. Полученные смеси инкубируют в течение ночи. Для определения количества несвязанного столбнячного токсина или анатоксина после инкубации смеси помещают в лунки планшета для ИФА, покрытые столбнячным антитоксином. Далее добавляют конъюгированные с пероксидазой антитела лошади против столбняка, после чего вносят субстрат. Измеряют оптическую плотность (*2.1.2.24*) и рассчитывают относительный титр антител с использованием общепринятых статистических методов (например, *2.3.12.0*.). Положительную и отрицательную контрольные сыворотки морской свинки включают в каждую постановку для контроля работы системы.

Реактивы и материалы

– круглодонные полистироловые планшеты;

– плоскодонные планшеты для ИФА;

– столбнячный анатоксин или столбнячный токсин;

– стандартный образец противостолбнячной антисыворотки морской свинки (положительная контрольная сыворотка), В качестве стандартного образца может быть использован *СО ФЕАЭС противостолбнячной антисыворотки морской свинки*;

– антитела лошади против столбняка;

– конъюгат пероксидазы: конъюгированные с пероксидазой антитела лошади против столбняка;

– карбонатный буферный раствор с pH 9,6. Растворяют 1,5 г *натрия карбоната безводного Р* и 2,39 г *натрия гидрокарбоната Р* и 0,2 г *натрия азида Р* в 1000 мл *воды Р*. Корректируют pH и стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 20 мин;

– натрий-ацетатный буферный раствор с pH 5,5. Растворяют 90,2 г *натрия ацетата безводного Р* в 900 мл *воды Р*, доводят pH насыщенным раствором *моногидрата лимонной кислоты Р* до значения 5,5 (*2.1.2.3*) и доводят до 1000 мл *водой Р*.

– фосфатно-солевой буферный раствор с pH 7,2. Растворяют 135,0 г *натрия хлорида Р*, 20,55 г *натрия гидрофосфата дигидрата Р* и 4,80 г *натрия дигидрофосфата моногидрата Р* в *воде Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 15000 мл. Стерилизуют автоклавированием при температуре 100 °С в течение 60 мин;

– разбавляющий буферный раствор: фосфатно-солевой буферный раствор с pH 7,2, содержащий 5 г/л *альбумина бычьего Р* и 0,5 г/л *полисорбата 80 Р*;

– блокирующий буферный раствор: фосфатно-солевой буферный раствор с pH 7,2, содержащий 5 г/л *альбумина бычьего Р*;

– раствор тетраметилбензидина. Раствор, содержащий 6 г/л *тетраметилбензидина Р* в *этаноле (96 %) Р (*растворяется в течение 30-40 мин при комнатной температуре).

– субстрат пероксидазы. Смешивают 90 мл *воды Р*, 10 мл натрий-ацетатного буферного раствора с pH 5,5, 1,67 мл раствора тетраметилбензидина и 20 мкл *водорода пероксида раствора концентрированного Р.*

– промывочный раствор. *Вода Р*, содержащая 0,5 г/л *полисорбата 80 Р.*

Методика

Помещают в лунки круглодонных полистирольных планшетов по 150 мкл блокирующего буферного раствора. Планшеты закрывают крышкой или герметизирующей пленкой и инкубируют при температуре 37 °С во влажной камере в течение часа. Промывают планшеты промывочным раствором и помещают в каждую лунку по 1000 мкл фосфатно-солевого буферного раствора с pH 7,2. Прибавляют в первую лунку ряда 100 мкл стандартного образца противостолбнячной антисыворотки морской свинки, в первую лунку необходимого количества рядов прибавляют по 100 мкл испытуемой сыворотки. Используя многоканальную микропипетку, делают двукратные последовательные разведения до колонки 10, перенося по 100 мкл из одной лунки в следующую. Удаляют по 100 мкл из лунок последней колонки так, чтобы все лунки содержали по 100 мкл. В каждую лунку, кроме лунок колонки 12, прибавляют по 40 мкл раствора столбнячного токсина или анатоксина (0,1 Lf/мл в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,2). Лунки колонки 11 используют в качестве положительного контроля. В лунки колонки 12 прибавляют по 40 мкл фосфатно-солевого буферного раствора с pH 7,2 (отрицательный контроль). Планшеты встряхивают осторожно и закрывают крышкой или герметизирующей пленкой.

Непосредственно перед использованием готовят подходящее разведение антител лошади против столбняка в карбонатном буферном растворе с pH 9,6 и помещают по 100 мкл в каждую лунку плоскодонного планшета для ИФА. Инкубируют во влажной камере при температуре 37 °С в течение ночи. Не следует складывать в стопку больше четырех планшетов, чтобы избежать эффекта температурного градиента. На следующий день планшеты тщательно отмывают промывочным раствором. В каждую лунку планшета прибавляют по 125 мкл блокирующего буферного раствора. Инкубируют во влажной камере при температуре 37 °С в течение одного часа. Отмывают планшеты промывочным буферным раствором.

В лунки плоскодонного планшета для ИФА помещают по 100 мкл смеси из лунок круглодонных полистирольных планшетов в колонку 12, далее с 1 по 11 колонки. Планшеты закрывают крышкой или клейкой пленкой и инкубируют при температуре 37 °С во влажной камере в течение двух часов. Отмывают планшеты промывочным буферным раствором.

Готовят подходящее разведение (например, 4000-кратное) конъюгата пероксидазы в разбавляющем буферном растворе и прибавляют по 100 мкл в каждую лунку. Планшеты закрывают крышкой или клейкой пленкой и нкубируют при температуре 37°°С во влажной камере в течение 1,5 ч. Отмывают планшет промывочным буферным раствором.

Прибавляют по 100 мкл субстрата пероксидазы в каждую лунку. Появляется синее окрашивание. Инкубируют при комнатной температуре в течение 10 мин, затем останавливают реакцию добавлением в том же порядке, в котором прибавляли субстрат пероксидазы, по 100 мкл 2 М раствора *серной кислоты Р.* Синее окрашивание сменяется желтым. Измеряют оптическую плотность (*2.1.2.24*) на подходящем спектрофотометре при длине волны 405 нм сразу после добавления серной кислоты. Допустимо хранение планшетов в защищенном от света месте до измерения оптической плотности.