

2.1.11.21. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИФТЕРИЙНОГО И СТОЛБНЯЧНОГО АНАТОКСИНОВ И ТОКСИНОВ В РЕАКЦИИ ФЛОКУЛЯЦИИ (МЕТОД РАМОНА)

В настоящей общей фармакопейной статье представлен метод определения содержания дифтерийного и столбнячного анатоксинов и токсинов по значению показателя флоккуляции методом Рамона.

Метод основан на реакции флоккуляции, которая происходит при смешивании специфического антитоксина в увеличивающихся концентрациях с постоянным количеством анатоксина или токсина (2.1.6.15. *Иммунохимические методы*). В точке эквивалентности антитоксина и анатоксина или токсина флоккуляция происходит в одной или более пробирках. Значение показателя флоккуляции (Lf) испытуемого образца определяют по пробирке, в которой раньше других наблюдают появление хлопьев (инициальная флоккуляция).

Lf анатоксина или токсина соответствует количеству единиц антитоксина, которое при смешивании с испытуемым образцом образует оптимальную флоккуляционную смесь (инициальная флоккуляция).

Результаты калибровки антитоксинов в Международных единицах (МЕ), например, при сравнении с международными стандартами антитоксинов, зависят от используемого иммунохимического метода. По этой причине антитоксины, используемые в методе Рамона, должны быть непосредственно откалиброваны по соответствующим международным стандартным образцам дифтерийного анатоксина для флоккуляции или столбнячного анатоксина для флоккуляции с использованием принципов, изложенных ниже. Концентрацию антитоксина в таком случае выражают в Lf-эквивалентах на 1 мл (Lf-экв/мл).

За 1 Lf принимают количество анатоксина или токсина, которое вступает в реакцию флоккуляции с 1 Lf-экв. специфического антитоксина за наиболее короткий промежуток времени.

Диапазон объемов стандартного образца специфического антитоксина в концентрации 100 Lf-экв./мл, распределяют в ряд пробирок размером 7 см × 1 см для флоккуляции. В каждую пробирку прибавляют раствор 9 г/л *натрия хлорида Р* до получения постоянного общего объема, например, 1 мл (таблица 2.1.11.21.-1). Испытуемый образец разводят подходящим растворителем до ожидаемой концентрации 50 Lf/мл и, например, по 1 мл прибавляют в каждую из пробирок, содержащих антитоксин. Содержимое пробирок тщательно перемешивают, избегая пенообразования, помещают на водяную баню при постоянной температуре от 30 °С до 52 °С и через равные промежутки времени наблюдают за первым появлением флоккулята, применяя, при необходимости, увеличительное стекло (лупу) и яркое освещение.

Таблица 2.1.11.21.-1. – Примерная схема внесения компонентов реакции флоккуляции

Наименование и характеристика раствора	Пробирки						
	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж
Содержание антитоксина в пробирке, Lf-экв.	35	40	45	50	55	60	65
Объем раствора стандартного образца антитоксина, мл	0,35	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60	0,65
Объем раствора 9 г/л <i>натрия хлорида Р</i> , мл	0,65	0,60	0,55	0,50	0,45	0,40	0,35
Объем разбавленного испытуемого образца, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Отмечают первую пробирку с флоккуляцией или первую и вторую пробирки (если флоккуляция произошла в двух пробирках одновременно) с инициальной флоккуляцией, а также время, прошедшее до наступления флоккуляции. Первая пробирка, в которой наблюдают флоккуляцию, содержит эквивалентные или близкие к эквивалентным количества антитоксина и антигена (анатоксина или токсина). Содержание антитоксина в этой пробирке используют для определения Lf испытуемого образца. Если инициальную флоккуляцию наблюдают одновременно в двух пробирках, для определения Lf испытуемого образца используют среднее значение содержания антитоксина в этих пробирках.

Если в примере (таблица 2.1.11.21.-1) пробиркой, в которой наблюдают инициальную флоккуляцию, является в пробирка Г, то значение показателя флоккуляции разведенного испытуемого образца составляет 50 Lf/мл. Если инициальная флоккуляция произошла в пробирках с наименьшим или наибольшим содержанием антитоксина (например, пробирки А или Ж в таблице 2.1.11.21.-1), результаты испытания не учитывают. Проводят повторное испытание, изменив разведение испытуемого образца или количество антитоксина.

Более точные результаты можно получить, используя для расчета значения показателя флоккуляции испытуемого образца пробирку с инициальной флоккуляцией и следующую пробирку, в которой (после первой) происходит флоккуляция. Если в примере (таблица 2.1.11.21.-1) второй пробиркой с флоккуляцией является пробирка Д, то значение показателя флоккуляции разбавленного испытуемого образца составляет 52 Lf/мл; если пробирка В – то 48 Lf/мл. Испытания проводят в двух повторностях с незначительными различиями в разведениях испытуемого образца.

Если применимо, повторяют испытание с объемами вносимого антитоксина, близкими по значению к эквивалентной концентрации, но с меньшими различиями во вносимых объемах. Так, если инициальная флоккуляция произошла в пробирке Г (таблица 2.1.11.21.-1), для уточнения эквивалентной концентрации повторяют испытание с использованием антитоксина, например, в объемах 0,46 мл, 0,48 мл, 0,50 мл, 0,52 мл, 0,54 мл.

Время, необходимое для появления флоккуляции в первой пробирке (Kf), является полезным индикатором качества антигена. Если при данной температуре и концентрации анатоксина или токсина и антитоксина значение Kf больше, чем значение, установленное при производстве, это может свидетельствовать о повреждении антигена. Время флоккуляции может меняться в зависимости от качества используемого антитоксина.

При отсутствии сведений о предполагаемом количестве анатоксина или токсина в испытуемом образце, определяют приблизительное значение Lf с использованием более широкого диапазона количества антитоксина в пробирках, например 20 Lf-экв., 30 Lf-экв., 45 Lf-экв., 70 Lf-экв., 100 Lf-экв., 150 Lf-экв., после чего выполняют основное испытание.

Концентрация антитоксина и анатоксина или токсина в испытании значительно влияет на время наступления инициальной флоккуляции. При высоких концентрациях начало флоккуляции может наступать настолько быстро, что трудно установить отличия во времени наступлении инициальной флоккуляции и флоккуляции в последующих пробирках. При очень низких концентрациях время наступления инициальной флоккуляции значительно увеличивается.

Количественное определение анатоксинов и токсинов с низкой концентрацией методом смешанной флоккуляции

Для анатоксинов и токсинов с низкой концентрацией предпочтительно использовать метод смешанной флоккуляции. Метод основан на сравнении анатоксина или токсина с известным Lf и смеси того же анатоксина или токсина с испытуемым образцом (анатоксином или токсином с неизвестной концентрацией).

Значение показателя флоккуляции смеси из анатоксинов с известной и неизвестной концентрациями будет равно сумме значений их показателей флоккуляции (при условии их

гомогенности). Если анатоксины или токсины не гомогенны, может возникнуть ложная картина с двумя флокуляционными максимумами.