

2.1.11.33. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КОКЛЮША ЦЕЛЬНОКЛЕТОЧНОЙ

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на биологический метод определения активности вакцины для профилактики коклюша цельноклеточной путем сравнения дозы, необходимой для защиты мышей от эффектов летальной дозы *Bordetella pertussis* при интрацеребральном введении, с количеством стандартного образца, калиброванного в международных единицах (МЕ), необходимым для обеспечения того же уровня защиты.

За международную единицу принимают активность определенного количества международного стандартного образца, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения. Международный стандартный образец представляет собой лиофилизированную вакцину для профилактики коклюша цельноклеточную.

Выбор и распределение животных

В испытании используют здоровых мышей подходящей линии из одной партии (стока), возрастом менее пяти недель. Разница в массе между самой тяжелой и самой легкой мышью не должна превышать 5 г. Животных распределяют на шесть групп, состоящих из не менее, чем по 16 особей (опытные группы) и четыре группы по 10 особей (контрольные группы). Все мыши в испытании должны быть одного пола, либо самцы и самки должны быть распределены поровну между группами.

Выбор тест-штамма и приготовление рабочей суспензии

Выбирают подходящий тест-штамм *B. pertussis*, способный вызывать гибель мышей в течение 14 сут после интрацеребрального введения. Штамм считают неподходящим, если более 20 % мышей погибают в течение 48 ч после интрацеребрального введения.

Выполняют субкультивирование штамма и суспендируют собранные клетки *B. pertussis* в растворе, содержащем 10 г/л гидролизата казеина Р и 6 г/л натрия хлорида Р, со значением pH 7,0–7,2, либо в другом подходящем растворе. Определяют мутность суспензии (2.1.2.1). Готовят серию разведений в том же растворе и распределяют каждое разведение на отдельную контрольную группу мышей. Вводят интрацеребрально каждой мыши дозу (0,02 мл или 0,03 мл) разведения, предназначенного для данной группы. Через 14 сут подсчитывают количество выживших мышей в каждой группе и рассчитывают ожидаемую концентрацию клеток микроорганизма в суспензии (степень мутности суспензии), содержащей 100 LD₅₀ в дозе рабочей суспензии.

Для проведения испытания вакцины из субкультуры того же штамма *B. pertussis* готовят рабочую суспензию с мутностью, соответствующей примерно 100 LD₅₀ в каждой дозе. Из рабочей суспензии готовят 3 разведения.

Определение активности

Готовят 3 последовательных разведения испытуемого образца и 3 аналогичных разведения стандартного образца таким образом, чтобы в промежуточном разведении можно ожидать защиты около 50 % мышей от летального действия заражающей дозы *B. pertussis*. Для испытуемого образца могут быть использованы дозы, соответствующие 1/8, 1/40 и 1/200 от дозы, рекомендованной к применению, и дозы стандартного образца, равные 0,5 МЕ, 0,1 МЕ и 0,02 МЕ, причем каждая доза содержится в объеме, не превышающем 0,5 мл. Распределяют 6 разведений (три разведения испытуемого образца и три разведения стандартного образца) по одному на каждую опытную группу и вводят внутривентрально каждой мыши по одной дозе разведения, предназначенного для ее группы.

Через 14–17 сут интрацеребрально вводят каждому животному в опытных группах дозу рабочей суспензии. Распределяют рабочую суспензию и три разведения из нее на каждую из контрольных групп мышей, и вводят интрацеребрально каждой мышке в группе соответствующую дозу. Исключают из рассмотрения мышей, которые умирают в течение 48–72 ч после заражения. Подсчитывают количество мышей, выживших в каждой из групп через 14 сут. Рассчитывают активность испытуемого образца относительно активности стандартного образца на основе количества выживших животных в каждой из опытных групп.

Результаты испытания являются достоверными, если:

- как для испытуемого образца, так и для стандартного образца PD_{50} находится между наибольшей и наименьшей дозами, вводимыми мышам;
- количество погибших животных в контрольных группах, которым вводили рабочую суспензию и разведения из нее, подтверждает дозу примерно в 100 LD_{50} ;
- статистический анализ подтверждает отсутствие отклонений от линейности или параллельности.

Испытание может быть проведено повторно, но если оно проводится более одного раза, достоверные результаты всех испытаний должны быть объединены.

Следующий раздел приводится для информации.

Пример методики количественного определения вакцины для профилактики коклюша цельноклеточной с использованием штамма *B. pertussis 18323* и мышей линии F1 CBA×C57Bl/6j.

Выбор и распределение животных. В испытании используют здоровых мышей линии F1 CBA×C57Bl/6j из одной партии (стока) с массой тела от 10 до 12 г.

Формируют шесть групп по 19 мышей в каждой (опытные группы) и одновременно для контроля рабочей суспензии из этой же партии (стока) формируют четыре группы по 10 мышей в каждой (контрольные группы).

Приготовление питательных сред

Фильтрат картофельного отвара. В 1000 мл воды *P* вносят 500 г очищенного мелко нарезанного картофеля и нагревают до кипения. В момент закипания добавляют 40 мл глицерина. Кипятят в закрытой посуде до полного разваривания картофеля в течение 1,0–1,5 ч. Доводят объем отвара водой *P* до 1000 мл и процеживают через двухслойную марлевую салфетку. Используют свежеприготовленным.

Среда Борде-Жангу

Последовательно растворяют в 1500 мл воды *P* 2,25 г калия дигидрофосфата *P*, 0,75 г дикалия гидрофосфата *P*, 1,5 г калия хлорида *P*, 0,075 г магния сульфата *P* и 7,5 г натрия хлорида *P*, при необходимости доводят хлороводородной кислотой *P* или натрия гидроксида раствором разбавленным *P* до значения pH 7,4–7,5 (2.1.2.3). Прибавляют 500 мл фильтрата картофельного отвара и 60 г агара микробиологического. Среду нагревают до полного растворения агара, при необходимости доводят хлороводородной кислотой *P* или натрия гидроксида раствором разбавленным *P* до значения pH 7,1–7,2 (2.1.2.3), разливают по 200 мл в стерильные флаконы вместимостью 500 мл, стерилизуют при температуре 110 °C в течение 30 мин и хранят при температуре от 2 °C до 8 °C не более трех месяцев. Перед применением нагревают до температуры 50–55 °C, прибавляют 60 мл дефибрированной крови (например, овечьей), перемешивают и разливают в чашки Петри. Срок хранения среды в чашках Петри не более 14 сут при температуре от 2 °C до 8 °C.

Гидролизат казеина

- | | |
|---------------------------|-----------|
| • Казеин | 2000,0 г |
| • Хлороводородная кислота | 1000,0 мл |
| • Вода | 500,0 мл |

Дрожжевой диализат

• Дрожжи хлебопекарные	1000,0 г
• Хлороформ	4,0 мл
• Вода	1000,0 мл

Казеиново-угольный агар

• Гидролизат казеина	170 мл
• Дрожжевой диализат	90 мл
• Дикалиягидрофосфат	0,5 г
• Магния хлорид	0,4 г
• Крахмал растворимый	1,5 г
• Кальция хлорид	0,01 г
или раствор кальция хлорида (10 г/л)	1,0 мл
• Железа (II) сульфат	0,01 г
или раствор железа (II) сульфата (5 г/л)	2,0 мл
• Меди сульфата пентагидрат	0,005 г
или раствор меди сульфата (2 г/л)	2,0 мл
• L-цистеин	0,03 г
или раствор L-цистеина (15 г/л)	2 мл
• Агар микробиологический	30,0 г
• Уголь активированный	2,0 г
• Вода	до 1000,0 мл

Среду нагревают до полного растворения агара, при необходимости доводят *хлороводородной кислотой Р* или *натрия гидроксида раствором разбавленным Р* до значения рН 7,0–7,1 (2.1.2.3), разливают по 200 мл в стерильные флаконы вместимостью 500 мл. стерилизуют при температуре 110 °С в течение 30 мин и хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного месяца. Перед применением нагревают до температуры 50–55 °С, вносят 20 мл дефибринированной крови (например, овечьей), перемешивают и разливают в чашки Петри. Срок хранения среды в чашках Петри не более 14 сут при температуре от 2 °С до 8 °С.

Допустимо применение соответствующих коммерчески доступных питательных сред.

Приготовление рабочей суспензии

Суспензию штамма *B. pertussis* 18323 получают из 20–24-часовой субкультуры второго (если иное не обосновано) пассажа на подходящей питательной среде (среда Борде-Жангу или казеиново-угольный агар).

Проводят микроскопию мазков, окрашенных по Граму; клетки *B. pertussis* должны быть морфологически однородны, без посторонней микрофлоры.

С использованием стерильного раствора 9 г/л *натрия хлорида Р* готовят суспензию бактериальных клеток с мутностью 5 МЕ (2.1.11.20. *Определение концентрации клеток микроорганизмов*), которая содержит около 5×10^9 колониеобразующих единиц (КОЕ) в мл, (исходная суспензия). Дальнейшие разведения суспензии делают в растворе, содержащем 10 г/л гидролизата казеина *Р* и 6 г/л *натрия хлорида Р* и имеющем значение рН 6,9–7,3. Исходную суспензию разводят последовательными шагами так, чтобы получить рабочую суспензию с заражающей дозой, содержащей около 7 000 микробных клеток в объеме 0,03 мл (не менее 100 LD₅₀). Рабочую суспензию последовательно разводят в 10, 50, 250 и 1250 раз для определения LD₅₀ штамма *B. pertussis* 18323 и проверки жизнеспособности клеток микроорганизма в суспензии (таблица 2.1.11.33.-1).

Таблица 2.1.11.33.-1. – Примерная схема разведения тест-штамма *B. pertussis* 18323

Кратность разведения	Кратность разведения (от предыдущей пробирки)	Объем суспензии бактериальных клеток из предыдущей пробирки, мл	Объем растворителя, мл	Количество бактериальных клеток, КОЕ в 0,03 мл (расчетное)	Назначение
7*	7	1	6	2×10^7	-
21*	3	1	2	7×10^6	-
210*	10	0,5	4,5	7×10^5	-
2100*	10	0,5	4,5	7×10^4	-
21000*	10	2	18	7×10^3	для заражения (рабочая суспензия)
10**	10	0,5	4,5	700	для определения LD ₅₀ штамма
50**	5	1,0	4,0	140	
250**	5	1,0	4,0	30	
1250**	5	1,0	4,0	6	

Примечания.

* – кратность разведения от исходной суспензии.

** – кратность разведения от рабочей суспензии

Сразу после приготовления, разведение в 1250 раз высевают по 0,1 мл на три чашки Петри со средой Борде-Жангу или казеиново-угольным агаром. Культуру инкубируют в термостате при температуре 36 °С в течение 3–4 сут. Для определения количества КОЕ в 0,03 мл суспензии проводят подсчет колоний на трех чашках Петри и делят полученное значение на 10.

В 0,03 мл суспензии в разведении в 1250 должно быть не более 20 КОЕ.

Определение активности.

Восстанавливают стандартный образец стерильным раствором 9 г/л *натрия хлорида Р* до получения концентрации 1,56 МЕ/мл (разведение I). Из разведения I делают два последующих пятикратных разведения (разведения II и III).

В качестве стандартного образца может быть использован *ФСО ЕАЭС иммуногенной активности вакцины для профилактики коклюша цельноклеточной*, калиброванный в международных единицах.

Испытуемый образец разводят стерильным раствором 9 г/л *натрия хлорида Р*, например, в 5 раз (разведение I). Из разведения I делают два последующих пятикратных разведения (разведения II и III).

Если полученное в опыте значение PD₅₀ испытуемого образца или стандартного образца не будет соответствовать критерию достоверности результатов испытания (находится между наибольшей и наименьшей дозами, вводимыми мышам), то корректируют разведение I.

Разведения испытуемого образца и стандартного образца хранят при температуре от 2 до 8 °С и используют в течение не более 4 ч.

Распределяют полученные разведения по одному на каждую опытную группу и вводят внутрибрюшинно по 0,5 мл каждой мыши по одной дозе разведения, предназначенного для ее группы. К моменту введения рабочей суспензии не менее 94 % иммунизированных мышей должно остаться в живых без признаков заболевания. Если гибель животных превышает указанную величину, то испытание не учитывают.

Через 14 – 17 дней каждому животному в опытных группах вводят интрацеребрально по 0,03 мл рабочей суспензии путем прокола лобной кости в точке, расположенной в 2 мм от средней линии и на 2 мм выше глаза. Для подтверждения величины LD₅₀ разведения рабочей суспензии в 10, 50, 250 и 1250 раз вводят мышам в контрольных группах интрацеребрально по 0,03 мл.

Мышей, погибших в течение первых трех суток после заражения, исключают из опыта (неспецифическая гибель); в каждой опытной группе оставляют по 16 мышей. За зараженными животными наблюдают 14 сут с ежедневной регистрацией их гибели. В день учета результатов на 14 сут в число погибших включают также всех парализованных мышей.

Вычисление величины LD₅₀ рабочей суспензии производят с учетом результатов, полученных для суспензии, разведенной в 10, 50, 250 и 1250 раз, по формуле Кербера:

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

- где D_N – максимальная доза суспензии штамма *B. pertussis*, КОЕ в 0,03 мл;
 δ – логарифм кратности разведения (отношение большей дозы к следующей за ней меньшей дозе);
 L_i – отношение количества погибших и парализованных животных при введении данной дозы суспензии штамма *B. pertussis* к общему числу животных, которым эта доза была введена;
 $\sum L_i$ – сумма значений L_i , рассчитанных для всех доз суспензии штамма *B. pertussis*.

Таблица 2.1.11.33.-2. – Расчет величины LD₅₀ рабочей суспензии штамма *B. pertussis* 18323

Количество бактериальных клеток, КОЕ в 0,03 мл (расчетное)	Количество зараженных животных	Количество погибших и парализованных из общего числа зараженных животных	L_i	LD ₅₀	Количество бактериальных клеток в разведении в 1250 раз, КОЕ в 0,03 мл (фактическое)
700	10	10/10	1,0	28	2
140	10	8/10	0,8		
30	10	5/10	0,5		
6	10	2/10	0,2		

$$\sum L_i = 2,5$$

$$\lg LD_{50} = \lg 700 - \lg 5 \cdot (2,5 - 0,5) = 2,8451 - 0,6990 \cdot 2,0 = 1,4471$$

LD₅₀ = 28 бактериальных клеток.

В рабочей суспензии (7×10^3 бактериальных клеток) содержится 250 LD₅₀.

Расчет активности испытуемого образца проводят по методу Вильсона и Вустера, с помощью программы Probit-analysis или любым другим подходящим методом.

Для проведения расчета по методу Вильсона-Вустера используют таблицу (таблица 2.1.11.33.-3), применимую к испытаниям с тремя дозами образца, различающихся пятикратными шагами разведений, по 16 животных для каждой дозы. По вертикали указаны величины, равные сумме выживших мышей от всех трех доз образца (А), по горизонтали – разница между количеством мышей, выживших от наибольшей и наименьшей доз образца (В). Табличные данные, располагающиеся на пересечении строк соответствующих величин А и В, содержат информацию о расчетной PD_{50} для условной дозы образца, равной 100, и ее стандартных отклонениях, выраженных в процентах.

Таблица 2.1.11.33.-3.-Данные для расчета PD_{50} по методу Вильсона-Вустера

41	10,1 48-208	14,5 66-154											
40	9,4 42-236	13,6 58-172	17,2 71-140										
39	9,4 38-260	13,4 53-187	17,0 66-153	20,3 76-133									
38	9,5 36-276	13,75 50-199	17,6 62-163	20,75 71-142	23,1 78-128								
37	10,2 35-288	14,5 48-208	18,5 59-170	21,7 67-148	24,3 74-134	25,9 80-125							
36	11,3 34-295	15,5 47-213	19,7 57-175	23,1 65-154	25,9 71-140	28,0 76-131	29,0 81-124						
35	12,3 34-296	17,0 46-217	21,3 56-178	25,1 64-157	28,0 70-144	29,9 74-135	31,4 78-128	32,9 81-124					
34	14,0 34-294	19,0 46-218	23,5 55-181	27,25 63-160	30,4 68-147	32,9 73-137	34,6 76-131	35,7 79-126	39,9 81-124				
33	16,5 35-288	21,7 46-217	26,3 55-181	29,9 62-161	33,5 67-149	35,7 72-140	38,1 75-133	39,3 78-129	40,6 80-125				
32	19,4 36-279	25,1 47-214	29,4 55-181	33,5 62-162	36,8 67-150	39,3 71-141	41,9 74-134	43,25 77-131	44,0 79-127	47,7 81-124			
31	23,1 37-268	29,0 48-210	34,0 56-180	38,1 62-162	41,3 67-150	44,0 70-143	46,2 73-136	47,75 76-132	48,5 78-128	50,0 80-125			
30	28,0 39-258	34,0 49-205	38,7 56-178	43,3 62-162	46,2 66-151	49,25 70-143	50,9 73-136	52,5 75-134	53,5 77-130	55,1 79-126	59,7 81-123	61,7 82-121	
29	34,0 41-244	39,9 50-201	44,7 57-176	49,25 62-161	52,5 66-151	55,1 70-144	56,9 72-139	57,8 75-134	59,7 77-130	60,7 79-126	62,75 81-123	64,8 82-121	
28	41,9 43-233	47,7 50-196	52,5 57-174	56,0 62-161	58,8 66-151	61,7 70-144	63,7 72-139	64,8 75-134	65,8 77-131	66,9 79-127	69,1 81-123	71,3 82-121	
27	51,7 43-224	56,9 52-192	61,7 58-173	64,6 63-160	66,9 66-151	69,1 70-144	71,3 72-139	72,5 74-135	72,5 76-131	73,6 79-128	74,8 81-123	76,41 82-121	
26	64,8 46-217	69,1 53-188	72,5 58-171	74,8 63-160	76,1 67-150	78,6 70-144	79,8 72-139	79,8 74-134	81,1 76-131	81,1 78-128	82,4 81-123	82,4 82-121	
25	79,8 47-211	82,4 54-187	85,1 59-170	86,5 63-159	87,9 67-150	87,9 70-144	89,25 72-139	89,25 74-134	89,25 76-131	90,8 78-128	90,8 81-123	90,8 82-121	
24	100 48-211	100 54-186	100 59-170	100 63-159	100 67-150	100 70-144	100 72-139	100 74-134	100 77-131	100 79-127	100 81-123	100 83-120	
23	125,3 47-211	121,3 54-187	117,5 59-170	115,6 63-159	113,7 67-150	113,7 70-144	111,75 72-139	111,75 74-134	111,75 76-131	110,25 78-128	110,25 81-123	110,25 82-121	
22	154,4 46-217	144,8 53-188	138,0 58-172	133,6 63-160	131,5 67-150	127,3 70-144	125,3 72-139	125,3 74-134	123,3 76-131	123,3 78-128	121,3 81-123	121,3 82-121	
21	193,3 45-224	175,7 52-192	162,2 58-173	154,4 63-160	149,5 66-151	144,75 70-144	140,2 72-139	138,0 74-135	138,0 76-131	135,8 79-128	133,6 81-123	131,5 82-121	
20	238,5 43-233	209,7 50-196	190,3 57-174	178,5 62-161	170,1 66-151	162,2 70-144	157,0 72-139	154,4 75-134	152,0 77-131	149,5 79-127	144,8 81-123	140,2 82-121	
19	294,0 41-244	250,3 50-201	223,6 57-176	203,0 62-161	190,3 66-151	181,4 70-144	175,7 72-139	172,9 75-134	167,4 77-130	164,7 79-126	159,5 81-123	154,4 82-121	

18	356,6 39-258	294,0 49-205	258,5 56-178	231,0 62-162	216,5 66-151	203,0 70-143	196,5 73-137	190,3 75-134	187,3 77-130	181,4 79-126	167,4 81-123	162,2 82-121
17	432,6 38-268	345,3 48-210	294,0 56-180	262,7 62-162	242,4 67-150	227,5 70-143	216,5 73-136	209,7 76-132	206,3 78-128	199,8 80-125		
16	516,5 36-279	399,1 47-214	339,8 55-181	298,7 62-162	271,2 67-150	254,6 71-141	238,5 74-134	231,0 77-131	227,5 79-127	209,7 81-124		
15	606,5 35-288	461,1 46-217	380,3 55-181	334,5 62-162	298,7 67-149	280,1 72-140	262,0 75-133	254,6 78-130	246,3 80-125			
14	712,3 34-294	524,8 46-218	425,7 55-181	368,2 63-160	329,1 68-147	303,6 73-137	289,3 76-131	280,1 79-126	250,3 81-124			
13	810,4 34-296	587,4 46-217	468,8 56-178	399,25 64-157	356,6 70-144	334,5 74-135	318,75 78-128	303,6 81-124				
12	908 34-295	647,6 47-213	508,6 57-175	432,6 65-154	386,5 71-140	356,6 76-131	345,3 81-124					
11	983 35-288	690,6 48-208	542 59-170	461,1 67-148	413,3 74-134	386,5 80-125						
10	1048 36-276	727,3 50-199	568,75 62-163	484,2 71-142	432,6 78-128							
9	1065 38-260	747,9 53-187	587,4 66-153	492 76-133								
8	1065 42-236	737,6 58-172	578 71-140									
7	999,25 48-208	691,25 66-153										
6	878,5 57-176											
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

Величину PD_{50} стандартного образца, выраженную в МЕ, вычисляют по формуле:

$$PD_{50_{cm.}} = \frac{I \times D}{100},$$

где I — величина PD_{50} , полученная по таблице для опытной группы животных, получивших среднюю дозу стандартного образца (разведение II);
 D — количество МЕ в средней дозе стандартного образца (разведение II).

Нижнюю границу стандартного отклонения для PD_{50} стандартного образца, выраженную в МЕ, вычисляют по формуле:

$$PD_{50_{cm.min}} = \frac{PD_{50_{cm.}} \times N_{нижн.}}{100},$$

где $PD_{50_{cm.}}$ — величина PD_{50} стандартного образца, вычисленная по формуле;
 $N_{нижн.}$ — значение нижней границы стандартного отклонения по таблице для группы животных, получивших среднюю дозу стандартного образца (разведение II)

Верхнюю границу стандартного отклонения для PD_{50} стандартного образца, выраженную в МЕ, вычисляют по формуле:

$$PD_{50_{cm.max}} = \frac{PD_{50_{cm.}} \times N_{верх.}}{100},$$

- где $PD_{50_{ст.}}$ – величина PD_{50} стандартного образца, вычисленная по формуле;
 $N_{верх.}$ – значение верхней границы стандартного отклонения по таблице для группы животных, получивших среднюю дозу стандартного образца (разведение II).

Величину PD_{50} испытуемого образца, выраженную в мл, вычисляют по формуле:

$$PD_{50_{исп}} = \frac{I \times D}{100},$$

- где I – величина PD_{50} , полученная по таблице для опытной группы животных, получивших среднюю дозу испытуемого образца (разведение II);
 D – количество неразведенного испытуемого образца в средней дозе испытуемого образца (разведение II), мл.

Нижнюю границу стандартного отклонения для PD_{50} испытуемого образца, выраженную в мл, вычисляют по формуле:

$$PD_{50_{исп, min}} = \frac{PD_{50_{исп}} \times N_{нижн.}}{100},$$

- где $PD_{50_{исп.}}$ – величина PD_{50} испытуемого образца, вычисленная по формуле;
 $N_{нижн.}$ – значение нижней границы стандартного отклонения по таблице для группы животных, получивших среднюю дозу испытуемого образца (разведение II).

Верхнюю границу стандартного отклонения для PD_{50} испытуемого образца, выраженную в мл, вычисляют по формуле:

$$PD_{50_{исп max}} = \frac{PD_{50_{исп}} \times N_{верх.}}{100},$$

- где $PD_{50_{исп}}$ – величина PD_{50} испытуемого образца, вычисленная по формуле;
 $N_{верх.}$ – значение верхней границы стандартного отклонения по таблице для группы животных, получивших среднюю дозу испытуемого образца (разведение II).

Таблица 2.1.11.33.-4.-Расчет PD_{50} и стандартного отклонения испытуемого образца и стандартного образца

Образец	Количество неразведенного образца в 0,5 мл разведения образца, мл	Количество МЕ в 0,5 мл, разведения образца, вводимого животным	Количество выживших мышей/общее число зараженных в группе	Величина А/В	PD_{50} и стандартное отклонение расчетные (по таблице)	PD_{50} и стандартное отклонение фактические (по формуле)
Стандартный	—	0,7800	13/16	16/12	231,0	0,3604 МЕ
		0,1560	2/16		77-134	0,4829-0,2775
		0,0312	1/16			
Испытуемый	0,100	—	12/16	17/12	209,7	0,0419 мл
	0,020		5/16		76-132	0,0553-0,0318
	0,004		0/16			

Примечание – приведен пример расчета PD_{50} и стандартного отклонения испытуемого образца и стандартного образца

Расчет PD_{50} стандартного образца с использованием данных таблицы 2.1.11.33.-4:

$$PD_{50_{cm.}} = \frac{231,0 \times 0,1560}{100} = 0,3604 \text{ ME},$$

$$PD_{50_{cm.min}} = \frac{0,3604 \times 77}{100} = 0,2775 \text{ ME},$$

$$PD_{50_{cm.max}} = \frac{0,3604 \times 134}{100} = 0,4829 \text{ ME},$$

Расчет PD_{50} испытуемого образца с использованием данных таблицы 2.1.11.33.-4:

$$PD_{50_{исп}} = \frac{209,7 \times 0,020}{100} = 0,0419 \text{ мл},$$

$$PD_{50_{исп.min}} = \frac{0,0419 \times 76}{100} = 0,0318 \text{ мл},$$

$$PD_{50_{исп.max}} = \frac{0,0419 \times 132}{100} = 0,0553 \text{ мл}.$$

Активность испытуемого образца в МЕ/мл вычисляют по формуле:

$$R = \frac{PD_{50_{cm.}}}{PD_{50_{исп}}},$$

где $PD_{50_{cm.}}$ – фактическая PD_{50} стандартного образца (вычисленная по формуле);
 $PD_{50_{исп}}$ – фактическая PD_{50} испытуемого образца (вычисленная по формуле).

Нижний предел доверительного интервала (R_{min}) и верхний предел доверительного интервала (R_{max}) в МЕ/мл вычисляют по формулам:

$$R_{min} = \frac{R}{K};$$

$$R_{max} = R \times K,$$

где R – активность испытуемого образца (вычисленная по формуле), МЕ/мл
 K – доверительный коэффициент.

Доверительный коэффициент вычисляют по формуле:

$$K = a \operatorname{ntilg} \sqrt{(S_1^2 + S_2^2)},$$

$$\text{где: } S_1 = \lg PD_{50_{исп.max}} - \lg PD_{50_{исп}},$$

$$S_2 = \lg PD_{50_{\text{исп}}} - \lg PD_{50_{\text{исп min}}}$$

Расчет активности испытуемого образца и доверительных интервалов с использованием данных таблицы 2.1.11.33.-4:

$$R = \frac{0,3604}{0,0419} = 8,6 \text{ ME/мл.}$$

$$K = \text{anti lg} \sqrt{(-0,3161 - (-0,4432))^2 + (-1,3778 - (-1,4976))^2} = \text{anti lg} \sqrt{0,0162 + 0,0144} = \text{anti lg} \sqrt{0,0306}$$

$$R_{\min} = \frac{8,6}{1,5} = 5,7 \text{ ME/мл.}$$

$$R_{\max} = 8,6 \times 1,5 = 12,9 \text{ ME/мл.}$$

Активность вакцины составляет 8,6 ME/мл с доверительным интервалом от 5,7 ME/мл до 12,9 ME/мл.