

2.1.11.34. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАКЦИНЫ (АНАТОКСИНА) ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ДИФТЕРИИ АДСОРБИРОВАННОЙ

Общая фармакопейная статья распространяется на методы определения активности вакцины (анатоксина) для профилактики дифтерии адсорбированной. Методы основаны на определении защитного действия вакцины (анатоксина) от заражения дифтерийным токсином иммунизированных морских свинок (методы 1 или 2) или на определении титра антител противодифтерийного токсина или 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.

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

В качестве стандартного образца может быть использован *СО ФЕАЭС вакцины (анатоксина) для профилактики дифтерии 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 моновалентные или комбинированные вакцины (анатоксины) получены из дифтерийного анатоксина одного и того же происхождения, содержащего сопоставимые уровни анатоксина в Лф/мл, то валидация методики, проведенная для вакцины (анатоксина) с максимальным количеством компонентов, может распространяться и на комбинированные вакцины (анатоксины) с меньшим числом компонентов, и на моновалентную вакцину (анатоксин), полученные в рамках этого же производственного процесса.

Метод испытаний вакцины (анатоксина) для профилактики дифтерии в составе комбинированных лекарственных препаратов, содержащих в одном флаконе также вакцину для профилактики коклюша цельноклеточную или вакцину против *Haemophilus B* конъюгированную с дифтерийным анатоксином или с дифтерийным белком *CRM 197* в качестве носителя, должен быть обоснован и валидирован для конкретного лекарственного препарата.

Для комбинированных вакцин (анатоксинов), содержащих анатоксин для профилактики дифтерии и анатоксин для профилактики столбняка, испытания методом 3 могут быть выполнены на той же группе животных, которую использовали для количественного определения вакцины (анатоксина) для профилактики столбняка адсорбированного (2.1.11.35), при соблюдении общих условий иммунизации для дифтерийного и столбнячного 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) 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 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: МЕТОД КОЖНЫХ ПРОБ НА МОРСКИХ СВИНКАХ

ВЫБОР И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

В испытании используют здоровых белых морских свинок, из одной партии (стока), разница в массе между животным не должна превышать 100 г, их размер должен быть достаточным для выбранного количества мест заражения. 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.

Если токсин, используемый для заражения, предварительно не стандартизирован или не установлена стабильность его свойств, дополнительно используют контрольную группу из пяти неиммунизированных животных.

ВЫБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАЗВЕДЕНИЙ ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА

Используют дифтерийный токсин, содержащий от 67 I_g/100 до 133 I_g/100 в 1 Lf и от 25000 до 50000 минимальных доз, вызывающих реакцию на коже морских свинок, в 1 Lf. Если стабильность токсина предварительно подтверждена, нет необходимости определять его активность для каждого испытания.

Токсин разводят непосредственно перед использованием подходящим растворителем до расчетной концентрации 0,0512 Lf в 0,2 мл. Далее из полученного разведения готовят серию из пяти четырехкратных разведений, содержащих около 0,0128 Lf; 0,0032 Lf; 0,0008 Lf; 0,0002 Lf; 0,00005 Lf в 0,2 мл.

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 приводило бы к внутрикожному провокационному индексу, равному 3 при внутрикожном введении токсина.

Распределяют разведения по одному на каждую группу морских свинок и вводят подкожно каждому животному по 1,0 мл разведения, предназначенного для данной группы. Через 28 сут каждой морской свинке выбривают оба бока и вводят каждому

животному внутрикожно в разные места по 0,2 мл каждого из шести разведений токсина так, чтобы минимизировать влияние рядом расположенных мест введений.

Если необходимо определить активность токсина, вводят неиммунизированным контрольным животным разведения токсина, содержащие 0,00008 Lf; 0,00004 Lf; 0,00002 Lf; 0,00001 Lf; 0,000005 Lf в 0,2 мл.

Через 48 ч все места введений на коже животных обследуют и фиксируют наличие специфической дифтерийной эритемы. Отмечают также количество мест введений без реакции. Вносят в таблицу значения внутрикожного провокационного индекса всех животных, получивших одинаковое разведение вакцины (анатоксина), и производят преобразование данных, чтобы определить относительную активность испытуемого образца с помощью модели параллельных прямых логарифмической зависимости «доза–ответ».

Результаты испытания являются достоверными, если:

- как для испытуемого образца, так и для стандартного образца внутрикожный провокационный индекс, полученный при введении минимальной дозы, составляет менее 3, а при введении максимальной дозы – более 3;
- при определении активности токсина разведение токсина 0,00004 Lf в 0,2 мл, вызывает дифтерийную эритему не менее чем у 80 % контрольных животных, а разведение токсина 0,00002 Lf в 0,2 мл – менее чем у 80 % (если требование не выполняется, следует выбрать другой токсин);
- доверительный интервал ($P=0,95$) относительной активности составляет не менее 50 % и не более 200 % от заявленной активности;
- статистический анализ подтверждает отсутствие значимых отклонений в линейности и параллельности.

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

МЕТОД 2: МЕТОД ЛЕТАЛЬНОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ НА МОРСКИХ СВИНКАХ

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.

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

ВЫБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАЗВЕДЕНИЙ ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА

Используют дифтерийный токсин, содержащий не менее 100 LD₅₀/мл. Если стабильность токсина подтверждена предварительно, нет необходимости определять его активность для каждого испытания.

Токсин разводят подходящим растворителем до концентрации 100 LD₅₀/мл непосредственно перед использованием. При необходимости выполняют разведения токсина 1:32, 1:100 и 1:320 тем же растворителем.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ

Готовят разведения испытуемого образца и аналогичные разведения 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 бы 50 % животных от летального действия определенного количества дифтерийного токсина.

Распределяют разведения по одному на каждую группу и вводят подкожно каждому животному по 1,0 мл разведения, предназначенного для данной группы. Через 28 сут всем иммунизированным животным вводят подкожно по 1,0 мл дифтерийного токсина, содержащего 100 LD₅₀.

Если необходимо определить активность токсина, токсин, содержащий 100 LD₅₀, и три его разведения распределяют по одному на каждую из контрольных групп животных и вводят подкожно каждой морской свинке по 1,0 мл раствора, предназначенного для данной группы.

Через четверо суток после введения токсина считают количество выживших животных. Активность испытуемого образца по отношению к активности стандартного образца рассчитывают на основании доли выживших животных в каждой группе иммунизированных морских свинок с использованием общепринятых статистических методов (например, 2.3.12.0.).

Результаты испытания являются достоверными, если:

- вычисленные значения PD₅₀ для испытуемого образца и стандартного образца находятся между значениями наибольшей и наименьшей доз, введенных животным;
- при определении активности токсина количество погибших морских свинок в четырех контрольных группах после введения разведений токсина, указывает на то, что доза введенного дифтерийного токсина приблизительно равна 100 LD₅₀;
- 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.

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) против дифтерии адсорбированной* или серия вакцины (анатоксина) для профилактики дифтерии, с доказанной стабильностью и эффективностью в клинических исследованиях или репрезентативная ей серия, калиброванные в международных единицах относительно *СО ФЕАЭС вакцины (анатоксина) для профилактики дифтерии адсорбированной* или международного стандартного образца.

Готовят не менее трех разведений испытуемого образца 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. Для стандартного образца используют разведения в диапазоне от

0,5 до 16 МЕ/мл, для испытуемого образца – диапазон разведений в соотношении, например, от 1:2 до 1:125.

Используют разведения для иммунизации как правило в течение 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 суток после иммунизации подходящим методом проводят забор образцов крови у каждого иммунизированного и неиммунизированного животного и готовят образцы сыворотки.

Исключают повторное замораживание/оттаивание образцов сыворотки. Работу с образцами сыворотки 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). Применимы метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) или метод с использованием культуры клеток *Vero*.

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 значимых 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.

Рекомендации по количественному определению вакцины (анатоксина) против дифтерии адсорбированной.

МЕТОД 3: ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ У МОРСКИХ СВИНОК

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ СЫВОРОТКИ

Для приготовления образца сыворотки можно применять следующую методику: переворачивают пробирку с образцом крови шесть раз и выдерживают при температуре 37 °С в течение 2 ч, затем, при температуре 4 °С в течение 2 ч, центрифугируют при комнатной температуре при 800 g в течение 20 мин. Сыворотку переносят в стерильные пробирки и хранят при температуре ниже –20 °С. Данная методика позволяет получить не менее 40 % сыворотки из образца крови.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРА АНТИТЕЛ

Приведенные ниже методы ИФА и с использованием культуры клеток *Vero* являются примерами иммунохимических методов, признанными подходящими для определения титра антител.

Определение титра антител в сыворотке морской свинки методом ИФА.

В лунки планшета для ИФА с адсорбированным дифтерийным анатоксином вносят

разведения сывороток животных, иммунизированных испытуемым образцом (испытуемая сыворотка) и стандартным образцом (стандартная сыворотка). 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;
- противодифтерийная сыворотка морской свинки, полученная при иммунизации морских свинок *СО ФЕАЭС вакцины (анатоксина)* для профилактики дифтерии адсорбированной (положительная контрольная сыворотка),
- противодифтерийная сыворотка морской свинки, полученная при иммунизации морских свинок подходящим стандартным образцом вакцины (анатоксина) для профилактики дифтерии адсорбированной (стандартная сыворотка),
- конъюгат пероксидазы: конъюгированные с пероксидазой кроличьи или козы антитела против IgG морской свинки;
- дифтерийный 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 в емкости по 150 мл и стерилизуют автоклавированием при температуре 121°C 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 до значения pH 4,0 раствором 400 г/л *натрия гидроксида Р*;
- промывочный раствор. Фосфатно-солевой буферный раствор с pH 4,0, содержащий 0,5 г/л *полисорбата 20 Р*;
- блокирующий раствор. Фосфатно-солевой буферный раствор с pH 4,0, 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)* растворяют в 20 мл *лимонной кислоты растворе Р*. Немедленно перед использованием прибавляют 5 мкл *водорода пероксида раствора концентрированного Р*.

Методика

Может быть использовано следующее расположение образцов в лунках планшета: для отрицательной контрольной сыворотки используют лунки ряда А–Н колонки 1, лунки рядов А–Н колонки 2 и А–Н колонки 12 – для стандартной сыворотки и положительной контрольной сыворотки; лунки рядов А–Н с 3 по 11 колонок используют для образцов испытуемой сыворотки.

Помещают в лунки планшета для ИФА по 100 мкл раствора дифтерийного анатоксина (0,5 Лf/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 планшет, чтобы избежать эффекта температурного градиента.

На следующий день планшеты тщательно отмывают промывочным раствором. В каждую лунку планшета прибавляют по 100 мкл блокирующего раствора. Инкубируют во влажной камере при температуре 37 °С в течение 1 ч. Отмывают планшеты промывочным раствором.

Вносят по 100 мкл блокирующего раствора во все лунки за исключением ряда А. Готовят подходящие разведения отрицательной контрольной сыворотки, положительной контрольной сыворотки, стандартной сыворотки (приблизительно от 0,01 МЕ/мл) и испытуемых сывороток. Располагают сыворотки в соответствии со схемой: отрицательную контрольную сыворотку для колонок 1, стандартную и 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 100 мкл из одной лунки в следующую. Удаляют 100 мкл из лунок последнего ряда так, чтобы все лунки содержали по 100 мкл. Инкубируют при температуре 37 °С в течение 2 ч. Отмывают промывочным раствором.

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

Прибавляют по 100 мкл субстратного раствора в каждую лунку. Инкубируют при комнатной температуре в темноте 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 с использованием клеточной культуры *Vero*.

Метод основан на регистрации цитотоксичности, которая может быть выполнена путем микроскопии клеток (определение клеточной морфологии) или макроскопически (по изменению цвета).

Предел обнаружения специфичен для каждого анатоксина и обычно составляет 0,05 МЕ/мл.

Максимальное разведение сыворотки, которое защищает клетки от действия дифтерийного токсина, принимают за конечную точку метода. Активность анатоксина выражают в международных единицах на миллилитр и рассчитывают по сравнению с подходящей стандартной сывороткой морской свинки или международным стандартным образцом.

Реактивы и материалы:

- планшеты для ИФА 96-луночные;
- флаконы культуральные 75 см²;
- дифтерийный токсин;
- противодифтерийная сыворотка морской свинки, полученная при иммунизации морских свинок *СО ФЕАЭС вакцины (анатоксина) для профилактики дифтерии адсорбированной* (положительная контрольная сыворотка),
- противодифтерийная сыворотка морской свинки, полученная при иммунизации морских свинок подходящим стандартным образцом вакцины (анатоксина) для профилактики дифтерии адсорбированной (стандартная сыворотка),
- культура клеток *Vero* (клетки почки африканской зеленой мартышки). Для проведения испытания пригодны пассажи П2—П15.

Методика

Тетразолия бромид восстанавливается в сине-черный формазан митохондриальными дегидрогеназами живых клеток и, следовательно, может быть использован для количественной оценки живых клеток, указывая на степень нейтрализации токсина анатоксином. Белые или бесцветные лунки указывают на отсутствие живых клеток вследствие недостаточной нейтрализации токсина анатоксином.

Реактивы и материалы:

- минимальная основная среда (MEM);
- эмбриональная телячья сыворотка;

- раствор антибиотиков (содержит 10000 единиц пенициллина, 10 мг стрептомицина и 25 мг амфотерицина в 1 мл);
- L-глутамина 200 мМ раствор;
- трипсин-ЭДТА;
- тетразолия бромид [3-(4,5-диметил-тиазолил)-2,5-дифенилтетразолий бромид];
- 1 М буферный раствор 2-[4-(2-Гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоновой кислоты (HEPES) с pH 8.1. Растворяют 18,75 г HEPES в 82,5 мл *воды Р* и 30,0 мл *натрия гидроксида 2 М раствора Р*;
- глюкозы раствор 10 %;
- полная культуральная среда: смешивают 200 мл MEM с 10 мл эмбриональной телячьей сыворотки, 3,0 мл 1 М буферного раствора HEPES с pH 8,1, 2,0 мл *глюкозы раствор 10 % Р*, 2,0 мл раствора антибиотиков и 2,0 мл L-глутамина 200 мМ раствора;
- забуференный солевой раствор с pH 7,4. Растворяют 10,0 г *натрия хлорида Р*, 0,125 г *калия дигидрофосфата Р*, 1,44 г *динатриягидрофосфатадигидрата Р* и 0,75 г *калия хлорида Р* в 1000 мл *воды Р*, при необходимости доводят pH до значения 7,4, и доводят до 1000 мл *водой Р*. Стерилизуют автоклавированием при температуре 120 С° в течение 15 мин;
- тетразолия бромид раствор. Растворяют 0,1 г тетразолия бромида в 20 мл забуференного солевого раствора с pH 7,4. Стерилизуют фильтрацией (0,2 мкм) и хранят во флаконах из темного стекла;
- раствор для корректировки значения pH. Смешивают 40 мл *кислоты уксусной Р*, 1,25 мл 1 М *хлородородной кислоты Р* и 8,75 мл *воды Р*;
- буферный раствор с pH 4,7 для экстракции. Растворяют 10 г *натрия сульфата Р* в *воде Р* и прибавляют 50 мл *диметилформамида Р*, доводят pH до значения 4,7 с помощью раствора для корректировки значения pH, доводят объём до 100 мл *водой Р*.

Клетки *Vero* культивируют во флаконах культуральных (например, 75 см²/250 мл) в термостате при температуре 36±1 °С в атмосфере с 5 % содержанием CO₂ при относительной влажности 90 %. Для выращивания используют полную культуральную среду. Через 6–7 сут культивирования формируется клеточный монослой, после чего культуральную среду удаляют, а клетки трижды отмывают трипсин-ЭДТА: культуральную среду осторожно удаляют пипеткой, прибавляют 1 мл смеси трипсин-ЭДТА, распределяют смесь по монослою и удаляют пипеткой. Повторяют процедуру дважды, а на третий раз помещают флакон в термостат на 5 мин, пока клетки не начнут отделяться от монослоя, для отделения клеток сильно постукивают по боковой стенке флакона. Ресуспендируют клетки в 6–25 мл свежей полной культуральной среды до получения гомогенной суспензии. Готовят суспензию клеток в полной культуральной среде с концентрацией около 4×10⁵ клеток/мл.

Помещают по 50 мкл полной культуральной среды во все лунки планшета кроме колонки 1. Прибавляют 100 мкл антитоксической сыворотки морской свинки (положительная контрольная сыворотка; рабочее разведение на полной культуральной среде 0,12 МЕ/мл) в лунку A1 и 50 мкл – в лунку A11. Прибавляют по 100 мкл испытуемых сывороток (в случае необходимости их разводят) в лунки от B1 до G1. Прибавляют по 50 мкл этих же сывороток в лунки рядов от B11 до G11 соответствующего ряда. Прибавляют 100 мкл отрицательной контрольной сыворотки в лунку H1 и 50 мкл в лунку H11. С помощью многоканального дозатора делают серийные двукратные разведения, перенося по 50 мкл из лунки в лунку (колонки от 1 до 10 для рядов от A до G и колонки от 1 до 8 для ряда H).

Дифтерийный токсин с известной активностью и содержанием Lf разводят полной культуральной средой до подходящей концентрации, содержащей не менее 4 минимальных цитопатических доз. Прибавляют по 50 мкл разведенного токсина в каждую лунку, кроме лунок H9 и H10 (контроль клеток), лунок рядов от A11 до H11 (контроль сывороток) и лунок рядов от A12 до H12 (контроль токсина). Прибавляют 100 мкл

разведенного токсина в лунку A12 и выполняют двукратные серийные разведения, перенося по 50 мкл из лунки в лунку (ряды от A12 до H12). Удаляют 50 мкл из лунки H12. Прибавляют по 50 мкл полной среды в лунки H9 и H10.

Закрывают планшет крышкой или клейкой пленкой и инкубируют 1 ч при комнатной температуре.

Прибавляют по 50 мкл суспензии, содержащей около 4×10^5 клеток/мл в каждую лунку. Планшет закрывают крышкой или клейкой пленкой и инкубируют в течение 6 дней при температуре 37 °C. Проверяют микробиологическую чистоту микроскопически.

Прибавляют в каждую лунку по 10 мкл тетразолия бромида раствора. Планшеты инкубируют при температуре 37 °C еще в течение 2–4 ч. Далее удаляют питательную среду и прибавляют в каждую лунку по 100 мкл буферного раствора с pH 4,7 для экстракции. Планшеты инкубируют при температуре 37 °C в течение ночи для завершения процесса экстракции. После завершения экстракции и растворения формазана планшеты оценивают визуально или методом спектрофотометрии (2.1.2.24) при длине волны 570 нм. Сине-черные лунки учитывают как отрицательные (все клетки живы, токсин нейтрализован анатоксином); белые или бесцветные лунки учитывают как положительные (клетки погибли, нейтрализация была не эффективной).

Активность испытуемой сыворотки морской свинки рассчитывают, сравнивая последнюю лунку с разведением стандартной сыворотки, полностью нейтрализующим токсин, с последней лункой разведения испытуемой сыворотки, демонстрирующим такой же эффект. Титр нейтрализующих антител получают путем умножения фактора разведения на количество МЕ/мл стандартной сыворотки в последней лунке. Тест считают достоверным, если все клетки в лунках контроля токсина погибли, а положительная контрольная сыворотка полностью нейтрализует токсин, по крайней мере, в первых двух разведениях.