

▼ БОТУЛІНОВИЙ АНТИТОКСИН ▲

Immunoserum botulinicum

BOTULINUM ANTITOXIN

ВИЗНАЧЕННЯ

▼ Рідкий або ліофілізований препарат ▲, який містить очищені фрагменти імуноглобуліну, ▼ отримані із сироватки або плазми імунізованих тварин ▲, які специфічно нейтралізують токсини, утворені *Clostridium botulinum* типів А, В або Е або сумішшю токсинів цих типів.

ВИРОБНИЦТВО

▼ Ботуліновий антитоксин (сироватку протиботулінічну) ▲ одержують фракціонуванням сироватки коней або інших ссавців, імунізованих проти токсинів *C. botulinum* типів А, В та Е.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

▼ Ботуліновий антитоксин ▲ специфічно нейтралізує токсини *C. botulinum* типів, зазначених на етикетці, роблячи їх безпечними для сприйнятливих до них тварин. Як альтернатива ▼ ботуліновий антитоксин ▲ може бути ідентифікований за допомогою придатного імунохімічного методу (2.7.1).

АКТИВНІСТЬ

Не менше 500 МО антитоксину на мілілітр для кожного типу А та В і не менше 50 МО ▼ антитоксину ▲ на мілілітр для типу Е.

▼ Згідно з положеннями Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою, випробування мають проводитися так, щоб використовувати мінімальну кількість тварин і завдавати найменших болю, страждань, стресу або тривалої шкоди. Описане нижче кількісне визначення пов'язане з важкими стражданнями тварин, і виробникам настійно рекомендується розробити та валідувати такі кількісні визначення, які дозволять зменшити кількість тварин, яких використовують, або уточнити чи замінити процедуру випробування для сприяння добробуту тварин. ▲

Активність ▼ ботулінового антитоксину ▲ визначають порівнянням дози, необхідної для захисту мишей від летальних ефектів, викликаних фіксованою дозою ботулінового токсину, з кількістю стандартного препарату ▼ ботулінового антитоксину ▲, потрібною для отримання такого самого захисту. Для цього порівняння потрібні стандартні препарати кожного типу ботулінового антитоксину, які калібровані в Міжнародних одиницях (МО), і придатні препарати ботулінових токсинів для використання як випробовувані токсини. Активність кожного ви-

пробовуваного токсину визначають відносно стандартного препарату; активність випробовуваного ▼ ботулінового антитоксину ▲ визначають тим самим методом відносно активності випробовуваного токсину.

Міжнародна одиниця антитоксину — це специфічна активність нейтралізації для ботулінових токсинів типів А, В й Е, які містяться у зазначеній кількості міжнародних стандартних препаратів, що складаються з певної кількості висушених імуносироваток коня. Еквівалент Міжнародних одиниць міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня організація охорони здоров'я.

Вибір випробовуваних тварин. Використовують мишей; різниця в масі тіла між найважчою і найлегшою твариною не має перевищувати 5 г.

Приготування випробовуваних токсинів. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ: ботуліновий токсин надзвичайно токсичний; під час виконання будь-якої процедури, в якій він використовується, потрібно бути винятково обережним. Токсини типів А, В та Е готують зі стерильних фільтратів приблизно 7-добових культур *C. botulinum* типів А, В та Е у рідкому середовищі. До фільтратів додають 2 об'єми гліцерину, концентрують, за потреби, діалізом проти гліцерину, і зберігають за температури 0 °С або дещо нижче.

Вибір випробовуваних токсинів. Обирають випробовуваний токсин кожного типу, визначаючи для мишей L+/10-дозу та LD₅₀; період спостереження — 96 год. Випробовувані токсини мають містити щонайменше 1000 LD₅₀ у L+/10-дозі.

Визначення випробовуваних доз токсинів (L+/10-доза). У придатній рідині готують розчини стандартних препаратів, що містять 0.25 МО антитоксину на мілілітр. Послідовно, використовуючи кожен розчин, визначають випробовувану дозу відповідного випробовуваного токсину.

Готують суміші розчинів стандартного препарату та випробовуваного токсину: кожна суміш містить по 2.0 мл розчину стандартного препарату, один із об'ємів серійного розведення випробовуваного токсину та ▼ достатній об'єм ▲ придатної рідини для доведення загального об'єму до 5.0 мл. Суміші витримують за кімнатної температури в захищеному від світла місці протягом 60 хв. Для кожної суміші використовують по чотири миші; кожній миші внутрішньоочеревинно вводять по 1.0 мл суміші. За мишами спостерігають протягом 96 год.

Випробовувана доза токсину — це кількість в 1.0 мл суміші, виготовленої з найменшої кількості токсину, що здатна, незважаючи на часткову нейтралізацію стандартним препаратом, спричинити загибель у період спостереження всіх чотирьох мишей, яким вводили суміш.

Визначення активності ▼ ботулінового антитоксину ▲. У придатній рідині готують розчини стандартних

препаратів, що містять 0.25 МО антитоксину на мілілітр.

Готують розчин випробовуваного токсину в придатній рідині, що містить 2.5 випробовувані дози на мілілітр.

Використовуючи по черзі кожен розчин токсину й відповідного стандартного препарату, визначають активність \blacktriangledown антитоксину \blacktriangleleft .

Готують суміші розчину випробовуваного токсину й випробовуваного \blacktriangledown антитоксину \blacktriangleleft : кожна суміш містить по 2.0 мл розчину випробовуваного токсину, один із розташованих послідовно об'ємів випробовуваного \blacktriangledown антитоксину \blacktriangleleft й \blacktriangledown достатній об'єм \blacktriangleleft придатної рідини для доведення загального об'єму до 5.0 мл. Також готують суміші розчинів випробовуваного токсину та розчину стандартного препарату: кожна суміш містить по 2.0 мл розчину випробовуваного токсину, один із розташованих послідовно об'ємів розчину стандартного препарату, орієнтованих на цей об'єм (2.0 мл), який містить 0.5 МО, і \blacktriangledown достатній об'єм \blacktriangleleft придатної рідини для доведення загального об'єму до 5.0 мл. Одержану суміш витримують за кімнатної температури в захищеному від світла місці протягом 60 хв. Для кожної суміші використовують по чотири миші; кожній миші внутрішньоочеревинно вводять по 1.0 мл суміші. За мишами спостерігають протягом 96 год.

Суміш, що містить найбільший об'єм \blacktriangledown антитоксину \blacktriangleleft , який не здатний захистити мишей від загибелі, містить 0.5 МО. Цю кількість використовують для обчислення активності \blacktriangledown антитоксину \blacktriangleleft в Міжнародних одиницях на мілілітр.

Випробування є придатним, якщо всі миші, яким вводили суміші, що містять 2.0 мл або менше розчину стандартного препарату, гинуть, а миші, яким вводили суміші, що містять більше, — виживають.

Після валідації відповідності методу LD_{50} активність препарату може бути оцінена іншими методами, наприклад біологічним кількісним визначенням на мишах кінцівок, використовуючи параліч або парез (абдукції пальців) як кінцеву точку, кількісним визначенням *ex vivo* з використанням діафрагмового нерва шийного сплетіння (*n. phrenicus*) миші, або методом, який базується на культурі клітин, або іншим придатним методом *in vitro*. Активність обчислюють відповідно до придатного стандартного препарату, відкаліброваного в Міжнародних одиницях.

МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають типи токсину *C. botulinum*, які нейтралізує препарат.

ІМУНОСИРОВАТКА ПРОТИ ОТРУТИ \blacktriangledown ГАДЮК, ЯКІ РОЗПОВСЮДЖЕНІ В ЄВРОПІ \blacktriangleleft

Immunoserum contra venena viperae europaeae

VIPER VENOM ANTISERUM, EUROPEAN

ВИЗНАЧЕННЯ

Імуносироватка проти отрути \blacktriangledown гадюк, які розповсюджені в Європі, \blacktriangleleft — препарат, який містить антитоксинові глобуліни, здатні нейтралізувати отруту одного або більше видів гадюк. Глобуліни одержують фракціонуванням сироватки тварин, імунізованих проти отрути або отрут.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ

Нейтралізує отруту *Vipera ammodytes* (гадюка носата), або *Vipera aspis* (гадюка аспідова), або *Vipera berus* (гадюка звичайна), або *Vipera ursinii* (лучна гадюка, гадюка степова західна, гадюка степова, гадюка Орсіні), або суміші цих отрут, які зазначені на етикетці, роблячи безпечними їх для сприйнятливих до них тварин.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Кожний мілілітр випробовуваного препарату має містити достатню кількість антитоксинових глобулінів для нейтралізації не менше 100 LD_{50} для мишей отрути *Vipera ammodytes* або *Vipera aspis* і не менше 50 LD_{50} для мишей отрут інших видів гадюк.

Активність імуносироватки проти отрути \blacktriangledown гадюк, які розповсюджені в Європі, \blacktriangleleft визначають встановленням дози, необхідної для захисту мишей від летального ефекту, викликаного фіксованою дозою отрути відповідного виду гадюк.

Вибір випробовуваних отрут. Використовують отрути певних видів гадюк, що мають нормальні фізико-хімічні, токсикологічні та імунологічні характеристики. Їх, переважно, ліофілізують і зберігають у темному місці за температури $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

Для використання як випробовувану вибирають отруту, визначаючи LD_{50} для мишей; період спостереження — 48 год.

Визначення випробовуваної дози отрути. Готують послідовні розведення отрути, відновленої в розчині 9 г/л натрію хлориду *R* або іншого ізотонічного розчинника, так, щоб середнє розведення в 0.25 мл містило очікувану дозу LD_{50} . Одержані розведення розбавляють рівним об'ємом використаного розчинника. Для кожного розведення використовують щонайменше 4 миші із масою тіла кожної від 18 г до 20 г. Кожній миші внутрішньовенно вводять по

0.5 мл кожного розведення. За мишами спостерігають протягом 48 год і реєструють кількість загинувших. Обчислюють LD_{50} , використовуючи звичайні статистичні методи.

Визначення активності випробовуваної імуносироватки (PD_{50}). Відновлену випробовувану отруту розводять так, щоб 0.25 мл розчину містили 5 LD_{50} випробовуваної дози (розчин випробовуваної отрути).

Готують серію розведень випробовуваної імуносироватки в розчині 9 г/л *натрію хлориду Рабо* іншого ізотонічного розчинника з коефіцієнтом розведення від 1.5 до 2.5. Використовують достатню кількість і діапазон розведень, які гарантують отримання кривої смертності у межах від 20 % до 80 % і дозволяють визначити статистичні варіації.

Готують суміші так, щоб 5 мл кожної суміші містили 2.5 мл одного розведення випробовуваної імуносироватки та 2.5 мл розчину випробовуваної отрути. Суміш витримують на водяній бані протягом 30 хв за температури 37 °С. Для кожної суміші використовують не менше 6 мишей із масою тіла кожної від 18 г до 20 г. Кожній миші внутрішньовенно вводять по 0.5 мл кожної суміші. За мишами спостерігають протягом 48 год і реєструють кількість загинувших. Обчислюють PD_{50} , використовуючи звичайні статистичні методи. Одночасно перевіряють значення LD_{50} у випробовуваній дозі отрути, використовуючи наведену вище методику. Обчислюють активність імуносироватки, використовуючи таку формулу:

$$\frac{(T_v - 1)}{PD_{50}}, (T_v - 1) / LD_{50}, \text{ де}$$

T_v — значення LD_{50} у випробовуваній дозі отрути.

У кожній дозі для миші суміші «імуносироватка — отрута» в кінцевій точці міститься одна LD_{50} отрути, яка залишається ненейтралізованою імуносироваткою, і саме ця ненейтралізована отрута здатна викликати загибель 50 % мишей, яким вводили суміш. Отже, кількість отрути, нейтралізованої імуносироваткою на одну LD_{50} менша, ніж загальна кількість у кожній дозі для мишей. Тому, оскільки активність імуносироватки визначають за LD_{50} в кожній дозі для мишей, формула обчислення активності містить $T_v - 1$, а не T_v .

Альтернативно можна обчислити кількість випробовуваної отрути в міліграмах, яка нейтралізується 1 мл або якимсь іншим встановленим об'ємом випробовуваної імуносироватки.

МАРКУВАННЯ

На етикетці зазначають отруту або отрути, проти яких ефективна імуносироватка.

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ: необхідно вжити відповідних заходів безпеки, щоб уникнути вдихання порошку отрут

гадюк, оскільки вони виявляють алергенні властивості.

ПРОЕКТ

ПРОЕКТ

ПРОЕКТ

ПРОЕКТ

ПРОЕКТ

ПРОЕКТ