

2.7.16. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ КАШЛЮКУ (АЦЕЛЮЛЯРНОЇ)

▼ За допомогою кількісного визначення вимірюють здатність вакцини для профілактики кашлюку (ацелюлярної) викликати (індукувати) утворення специфічних антитіл у мишей або мурчаків. Титри антитіл для кожного антигену визначають за допомогою придатного імунохімічного методу (2.7.1), такого як імуноферментний аналіз (ІФА, *ELISA*).

Результати кількісного визначення можуть бути виражені:

- або як відношення середнього геометричного титру (СГТ, GMT) антитіл, отриманих після введення випробовуваної вакцини до СГТ антитіл, отриманих після введення стандартної вакцини, випробовуваної паралельно (кількісне визначення відносної активності);
- або безпосередньо як СГТ антитіл, індукованих випробовуваною вакциною (кількісне визначення у одиницях середнього геометричного (СГО, GMU) або кількісне визначення СГО). ▲

Для комбінацій, що містять компоненти кашлюку разом з дифтерійним та правцевим компонентами, серологічний аналіз у мурчаків може проводитись на тій самій групі тварин, що використовувались під час серологічного кількісного визначення вакцини для профілактики дифтерії (адсорбованої) (2.7.6) та правця (адсорбованої) (2.7.8), якщо підтверджено, що звичайні умови імунізації для всіх компонентів (наприклад, дози, тривалість) дійсні для комбінованих вакцин. Модель із використанням мурчаків дозволяє значно зменшити кількість необхідних тварин та повинна розглядатись кожним аналітиком під час випробування, яке відповідає положенню Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються у дослідних та інших наукових цілях.

▼ Під час розробки методу А і В, наведених нижче, проводять випробування декількох розведень випробовуваної вакцини та стандартної вакцини або внутрішнього контролю (див. Глосарій), щоб визначити, які розведення є придатними. Після того, як розведення підтверджені як придатні для даної вакцини, рекомендується, відповідно до принципів 3R (Replacement, Reduction, Refinement), застосувати спрощену модель, таку як разове (одиничне) розведення як для випробовуваної вакцини, так і для стандартної вакцини або внутрішнього контролю. Така модель дозволяє аналітику визначити, чи є імуногенність випробовуваної вакцини задовільною.

Для контролю ефективності серологічного кількісного визначення (із разовим або багаторазовими розведеннями) придатними показниками є:

- середнє геометричне та геометричне стандартне відхилення титрів антитіл у зразках сироватки крові, отриманих після введення фіксованої дози стандартної вакцини або внутрішнього контролю;
- титри антитіл контрольних проб (позитивний контроль та негативні зразки сироватки).

Може знадобитися повторне підтвердження придатності обраного розведення за допомогою кількісних визначень із багаторазовими розведеннями, наприклад, після значних змін у процесі виробництва або для дослідницьких цілей. ▲

МЕТОД А. СЕРОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ НА МИШАХ

▼ Наступна модель випробування наводиться як приклад кількісного визначення із багаторазовими розведеннями, яке може стати основою для встановлення кількісного визначення із одноразовим розведенням.

Вибір та розподіл випробовуваних тварин. У випробуванні використовують здорових мишей (наприклад, штаму CD1 з одного джерела надходження, віком старше 5 тижнів). Тварин розподіляють щонайменше на 6 рівних груп; використовують групи з кількістю тварин, яка достатня для забезпечення попередньо визначених критеріїв варіабельності відповідей (реакції) антитіл («імунової відповіді»), зазначених у розділі «Обчислення та критерії придатності». Використовують серійні розведення випробовуваної вакцини та стандартної вакцини або внутрішнього контролю, та розподіляють кожне розведення одній групі мишей. Під час валідаційних досліджень як негативний контроль може бути використана додаткова група мишей, яким ін'єкційно вводять тільки розчинник.

Імунізація. Вводять внутрішньоочеревинно або підшкірно кожній миші по 0.5 мл розведення, яке закріплене (розподілене) за її групою.

Збирання зразків сироватки. Через 4-5 тижні після вакцинації під наркозом індивідуально проводять забір крові у мишей. До використання для визначення антитіл сироватку зберігають за температури -20°C . Уникають частих заморожувань та розморожувань зразків сироватки.

Стандартна імуносироватка. Основою для обчислення титру рівнів антитіл у випробовуваних сироватках є стандартна імуносироватка встановленої активності. БСП сироватки мишей до *Bordetella pertussis* є придатним для використання як стандартна імуносироватка. ▲

■

Визначення антитіл. Кількісне визначення вмісту специфічних антитіл до кожного ацелюлярного кашлюкового антигена проводять в індивідуальних сироватках з використанням валідованого методу, такого як імуоферментний метод *ELISA*, що наведений нижче.

Імуоферментний метод *ELISA*. Планшети для мікротитрування (полівінілхлорид або полістирол, залежно від специфічного антигену, який використовують) покривають очищеним антигеном у концентрації 100 нг на лунку. Після промивання сайти, що не прореагували, блокують розчином альбуміну з сироватки бика з подальшою інкубацією планшетів, а потім знову промивають. Готують на планшетах 2-кратні розведення індивідуальних сироваток мишей, імунізованих випробовуваною чи **будь-якою** стандартною вакциною або внутрішнім контролем. Стандартну імуносироватку включають до кожного планшету. Після інкубації за температури від 22 °С до 25 °С протягом 1 год планшети промивають. Придатний розчин кон'югованих з ферментом антитіл до *IgG* мишей додають в кожну лунку та інкубують за температури від 22 °С до 25 °С протягом 1 год. Після промивання додають хромогенний субстрат, який зв'язується з ферментом кон'югату та вивільняє хромофор, який може бути кількісно визначений вимірюванням оптичної густини (2.2.25).

■

МЕТОД В. СЕРОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ НА МУРЧАКАХ

Наступна модель випробування наводиться як приклад кількісного визначення із багаторазовими розведеннями, яке може стати основою для встановлення кількісного визначення із одноразовим розведенням.

Вибір та розподіл випробовуваних тварин. У випробуванні використовують здорових мурчаків з одного джерела постачання, кожен вагою 250-350 г. Використовують мурчаків однієї статі або рівномірно розподіляють самців та самок за групами. Мурчаків розподіляють щонайменше на 6 рівних груп; використовують групи, які містять кількість тварин, достатню для забезпечення попередньо визначених критеріїв варіабельності відповідей (реакції) антитіл («імуної відповіді»), зазначених у розділі «Обчислення та критерії придатності». Під час валідаційних досліджень як негативний контроль може бути використана додаткова група мурчаків, яким ін'єкційно вводять тільки розчинник.

■

Розведення випробовуваних та стандартних вакцин. Готують серійні розведення випробовуваної та стандартної вакцин або внутрішнього контролю, використовуючи розчин 9 г/л натрію хлориду *P*; ви-

явлено, що придатними є серії розведень, що відрізняються з кроком від 2.5 до 5 разів. Використовують не менше 3 розведень у зазначених межах діапазону, придатного для всіх компонентів випробовуваної вакцини. Розведення використовують для імунізації переважно (найкраще) протягом 1 год після приготування. Розподіляють по 1 розведенню на кожну групу мурчаків.

Імунізація. Вводять підшкірно кожному мурчаку по 1.0 мл розведення, яке закріплене (розподілене) за даною групою.

Збирання зразків сироватки. Через 5-6 тижнів після імунізації у кожного вакцинованого та негативного контрольного мурчака придатним методом відбирають пробу крові. Сироватку до використання для визначення антитіл зберігають за температури -20 °С. Уникають частих заморожувань та розморожувань зразків сироватки.

Стандартна імуносироватка. Основою для обчислення титру рівнів антитіл у випробовуваних сироватках є стандартна імуносироватка встановленої активності.

Визначення антитіл. Кількісне визначення вмісту специфічних антитіл до кожного ацелюлярного кашлюкового антигена проводять в індивідуальних сироватках з використанням валідованого методу, такого як імуоферментний метод *ELISA*, що наведений нижче.

Імуоферментний метод *ELISA*. Придатні 96-лункові планшети для мікротитрування покривають очищеним антигеном (наприклад, кашлюковим токсином (PT), пертактином (PRN), філаментним гемаглютиніном (FHA) та/або фімбріальним аглютиногеном (Fim 2/3)), що є компонентом комбінованої вакцини, у концентрації 200-400 нг на лунку. Після промивання неактивні сайти, що не прореагували, блокують придатним блокувальним буфером із подальшою інкубацією планшетів, а потім знову промивають. Готують на планшетах 2-кратні розведення індивідуальних сироваток мурчаків, імунізованих випробовуваною чи **будь-якою** стандартною вакциною або внутрішнім контролем. Стандартну імуносироватку включають до кожного планшету. Після інкубації за температури 37 °С протягом 1 год планшети промивають. Придатний розчин кон'югованих з ферментом антитіл до *IgG* мурчаків додають в кожну лунку та інкубують за температури 37 °С протягом 1 год. Після промивання додають хромогенний субстрат, який зв'язується з ферментом кон'югату та вивільняє хромофор, що може бути кількісно визначений вимірюванням оптичної густини (2.2.25).

■

ОБЧИСЛЕННЯ ТА КРИТЕРІЇ ПРИДАТНОСТІ

Кількісне визначення відносної активності. Титри антитіл у сироватках мишей або мурчаків, імунізованих випробовуваною та стандартною вакцинами, визначають для кожного ацелюлярного антигену кашлюку, використовуючи стандартну імуносироватку. Використовуючи отримані значення, для кожного антигену обчислюють відношення СГТ випробовуваної вакцини у відношенні до стандартної вакцини.

Кількісне визначення відносної активності вважається придатним, якщо:

- кількість тварин-респондентів для випробовуваної та стандартної вакцин відповідає попередньо визначеним критеріям;
- СГТ для стандартної вакцини знаходиться в межах контрольної діаграми (контрольного графіка);
- варіабельність відповідей (реакцій) антитіл відповідає попередньо визначеним критеріям.

Кількісне визначення СГО. Титри антитіл у сироватках мишей або мурчаків, імунізованих внутрішнім контролем та випробовуваною вакциною, визначають для кожного ацелюлярного антигену кашлюку, використовуючи стандартну імуносироватку, та обчислюють СГТ-ів для кожного антигену.

Кількісне визначення СГО вважається придатним, якщо:

- кількість тварин-респондентів для випробовуваної вакцини та внутрішнього контролю відповідає попередньо визначеним критеріям;
- СГТ для внутрішнього контролю знаходиться в межах контрольної діаграми (контрольного графіка);
- варіабельність відповідей (реакцій) антитіл відповідає попередньо визначеним критеріям.

ГЛОСАРІЙ

Внутрішній контроль для кількісного визначення СГО. Серія вакцини, продемонстрована як репрезентативна поточного виробничого процесу, та для якої належним чином були проведені вимірювання реакцій мишей або мурчаків. Стабільність внутрішнього контролю необхідно контролювати та документувати.

Стандартна вакцина. Серія вакцини, що продемонструвала свою ефективність у клінічних випробуваннях, або репрезентативний представник серії. Стабільність стандартної вакцини необхідно контролювати та документувати.

Тварини-респонденти. Імунізовані тварини, які виробляють антитіла з титром, який перевищує поріг, визначений під час розробки та валідації методу. ▲

Наведений нижче розділ має інформаційний характер.

Керівництво щодо кількісного визначення вакцини для профілактики кашлюку (ацелюлярної)

МЕТОД В. ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ У МУРЧАКІВ

Нижче наведений приклад придатного імунохімічного методу ELISA.

Визначення титру антитіл методом ELISA для кашлюкового токсину (PT), філаментного гемаглютинину (FHA), фімбріального аглютиногену (FIM 2/3) та пертактину (PRN). У планшетах ELISA, покритих антигенами ацелюлярного кашлюку (PRN, PT, FHA або FIM 2/3), готують 2-кратні розведення сироваток для випробовуваної та стандартної вакцин ▼ або внутрішнього контролю ▲. У кожному планшеті передбачають стандартну імуносироватку та негативний контроль сироватки мурчаків. До кон'югованих пероксидазою антитіл кроля або кози до IgG мурчаків додають субстрат для пероксидази. ■

Реактиви та обладнання:

- *Планшети для ELISA:* 96 лунок, 1-12 стовпців, ряди від А до Н.
- *Стандартна імуносироватка мурчаків.*
- *Пероксидазний кон'югат.* Кон'юговані пероксидазою антитіла кроля або кози до IgG мурчаків.
- *Антигени Bordetella pertussis (PRN, PT, FHA або Fim 2/3).*
- *Покривний карбонатний буфер рН 9.6.* 1.59 г натрію карбонату безводного Р та 2.93 г натрію гідрокарбонату Р розчиняють в 1000 мл води Р. Отриманий розчин розливають у флакони місткістю 150 мл та стерилізують автоклавуванням за температури 121 °С протягом 15 хв.
- *Фосфатно-сольовий буфер рН 7.4 (PBS).* 80.0 г натрію хлориду Р, 2.0 г калію гідрофосфату Р, 14.3 г динатрію гідрофосфату дигідрату Р та 2.0 г калію хлориду Р перемішуючи розчиняють в 1000 мл води Р. Зберігають за кімнатної температури, щоб запобігти кристалізації. Перед застосуванням розчин розводять є 10 разів водою Р.
- *Розчин кислоти лимонної.* 10.51 г кислоти лимонної Р розчиняють в 1000 мл води Р та доводять рН розчину до 4.0, використовуючи розчин 400 г/л натрію гідроксиду Р.
- *Промивний буфер.* PBS, що містить 0.5 г/л полісорбату 20 Р.
- *Блокувальний буфер.* PBS, що містить 0.5 г/л полісорбату 20 Р та 25 г/л сухого знежиреного молока.
- *Субстрат пероксидази.* Незадовго до використання 10 мг діамонію 2,2'-азинобіс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонату) Р (ABTS) розчиняють в 20 мл розчину кислоти лимонної. Безпосередньо перед використанням додають 5 мкл водню пероксиду розчину концентрованого Р.

Метод. Нижче як приклад наведено опис розкладки (схема) планшета, але можна це провести інакше. Лунки 1 А-Н використовують для негативної контрольної сироватки, лунки 2-12 А-Н — для стандартної сироватки мурчаків (зазвичай у двох повторностях) та індивідуальних сироваток мурчаків, імунізованих випробовуваною ■ чи ▽будь-якою▲ стандартною вакциною ▽або внутрішнім контролем▲.

Кожну лунку планшета для *ELISA* покривають 100 мкл відповідного розчину антигена (РТ, FНА та Fim 2/3 у концентрації 2 мкг/мл та РРТ у концентрації 4 мкг/мл у покривному карбонатному буфері рН 9.6). Інкують протягом ночі за температури 4 °С у вологому середовищі. Щоб уникнути ефектів температурного градієнта, більше 4 планшетів у висоту не складають. На наступний день ретельно промивають планшети промивним буфером. Планшети блокують, додаючи в кожную лунку по 150 мкл блокувального буфера. Інкують у вологому середовищі за температури 37 °С протягом 1 год. Планшети ретельно промивають промивним буфером. По 100 мкл блокувального буфера додають в кожную лунку крім ряду А. Готують придатні розведення індивідуальних зразків сироваток випробовуваної та стандартної вакцин, стандартної імуносироватки та негативного контрольного зразка сироватки. Розподіляють негативну контрольну сироватку по стовпцю 1, стандартну імуносироватку принаймні по 2 інших стовпцях. До решти стовпців окремо розподіляють сироватку випробовуваної та стандартної вакцин. Додають по 100 мкл кожної сироватки до перших 2 лунок відповідного стовпця. Використовуючи мультиканальну мікропіпетку, роблять двократне серійне розведення від ряду В вниз до ряду Н, переносячи по 100 мкл з однієї лунки до наступної. Відбирають 100 мкл з останнього ряду, залишаючи тим самим у всіх лунках по 100 мкл. Інкують за температури 37 °С протягом 2 год. Ретельно промивають планшети промивним буфером. Готують придатне розведення кон'югата пероксидази в блокувальному буфері та додають по 100 мкл в кожную лунку. Інкують за температури 37 °С у вологому середовищі протягом 1 год. Ретельно промивають планшети промивним буфером. До кожної лунки додають по 100 мкл субстрату пероксидази. Витримують за кімнатної температури в захищеному від світла місці протягом 30 хв. Планшети переглядають за довжини хвилі 405 нм в тому самому порядку, в якому додавали субстрат.