

МЕТОД

Випробовувані розчини. У разі ліофільно висушених препаратів їх відновлюють відповідно до зазначень на етикетці. Готують із використанням розчину PBS-BSA щонайменше у трьох незалежних повторностях не менше трьох серійних півтора- або дворазових розведень, починаючи з концентрації в діапазоні 1.2-0.15 МО/мл. За потреби, вихідне розведення корегують із метою отримання відповідей, що потрапляють в область лінійності графіка залежності «доза-відповідь».

Стандартні розчини. Відновлюють стандартний препарат відповідно до зазначень на етикетці. Готують із використанням розчину PBS-BSA щонайменше у трьох незалежних повторностях не менше трьох серійних півтора- або дворазових розведень, починаючи з концентрації в діапазоні 1.2-0.15 МО/мл. За необхідності вихідне розведення корегують з метою отримання відгуків, що потрапляють в область лінійності графіка залежності «доза-відповідь».

У кожну лунку ▽ мікропланшета ▲ розподіляють по 50 мкл D-позитивних еритроцитів. До вмісту лунок кожного ряду додають по 50 мкл кожного з розведень випробовуваного або стандартного розчинів. Як негативний контроль використовують 50 мкл розчину PBS-BSA. По 50 мкл D-негативних еритроцитів розподіляють в чотири лунки ▽ мікропланшета ▲ та додають по 50 мкл найменшого розведення випробовуваного розчину. Для відстеження помилкових реакцій розподіляють по 50 мкл D-позитивних еритроцитів у чотири лунки того ж ▽ мікропланшета ▲ та додають по 50 мкл розчину PBS-BSA. Закривають пластиковою плівкою та інкубують за температури 37 °C протягом 40 хв.

Планшети центрифугують за 50 g протягом 3 хв, відбирають надосадову рідину (супернатант) та промивають лунки 200-250 мкл розчину PBS-BSA. Повторюють промивання щонайменше один раз.

Планшети центрифугують за 50 g протягом 3 хв, відбирають надосадову рідину (супернатант) та додають по 50 мкл вторинних антитіл, розведених розчином PBS-BSA до придатної концентрації білка. Закривають пластиковою плівкою та інкубують за кімнатної температури в захищеному від світла місці протягом 20 хв.

Планшети центрифугують за 50 g протягом 3 хв, відбирають надосадову рідину (супернатант) та промивають лунки 200-250 мкл розчину PBS-BSA. Повторюють промивання щонайменше один раз.

Планшети центрифугують за 50 g протягом 3 хв, клітини ресуспендують у 200-250 мкл розчину PBS-BSA. Суспензію клітин переносять в пробірку, сумісну з наявним обладнанням для проточної цитометрії, та проводять подальше розведення додаванням PBS для забезпечення придатної швидкості потоку.

Негайно приступають до вимірювання середньої інтенсивності флуоресценції за допомогою проточної цитометрії. Реєструють принаймні 10000 подій без стробування, але виключаючи шуми.

З використанням середньої інтенсивності флуоресценції в лінійній області кривої «доза-відповідь», оцінюють активність випробовуваного препарату звичайними статистичними методами (5.3).

2.7.15. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ГЕПАТИТУ В (рДНК)

Кількісне визначення вакцини для профілактики гепатиту В (рДНК) проводять або *in vivo* порівнянням здатності вакцини та стандартного препарату в певних умовах індукувати утворення специфічних антитіл проти поверхневого антигена (HBsAg) гепатиту В у мишей або мурчаків, або *in vitro* імунохімічним визначенням вмісту антигена.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ *IN VIVO*

Вибір та розподіл випробовуваних тварин. У випробуванні використовують здорових мишей одного приплоду віком близько п'ять тижнів. Лінія мишей, що використовують для цього випробування, має давати значний нахил у кривій доза-відповідь до антигену: придатними є миші з гаплотипом H-2^q або H-2^d. Здорові мурчаки одного приплоду масою від 300 г до 500 г (віком близько сім тижнів) також вважаються придатними для випробування. Використовують тварин однієї статі. Тварин рівномірно розподіляють за 7 групами, кількість тварин в яких відповідає вимогам випробування.

Визначення активності випробовуваної вакцини. Використовуючи розчин 9 г/л *натрію хлориду P*, до складу якого входить ад'ювант, що містить алюміній, використаний у вакцині, готують не менше 3 розведень випробовуваної вакцини та відповідні розведення стандартного препарату. За кожною групою тварин закріплюють по одному розведенню та кожній тварині групи підшкірно вводять не більше 1.0 мл відповідного розведення. Одну групу тварин використовують як невакцинований контроль та кожній тварині цієї групи внутрішньоочередно вводять таку саму кількість розчинника. Після відповідного інтервалу часу (наприклад, від 4 до 6 тижнів) проводять анестезію тварин та їх знекровлення, ▽ зберігають індивідуальні сироватки окремо ▲. У кожній індивідуальній сироватці придатним імунохімічним методом (2.7.1) кількісно визначають специфічні антитіла до HBsAg.

Обчислення. Обчислення проводять звичайними статистичними методами ▽ для випробовувань, що ґрунтуються на кількісній оцінці результатів ▲ (5.3).