

пробірки у 2 послідовних серіях у такому порядку:  $S_1, S_2, S_3, S_4, T_1, T_2, T_3, T_4, T_1, T_2, T_3, T_4, S_1, S_2, S_3, S_4$ . Витримують протягом не менше 1 хв на водяній бані або в нагрівальному пристрої до встановлення температури  $37^\circ\text{C}$ , та додають у кожну пробірку 100 мкл фактора Ха біка розчину Р2. Інкують точно 2 хв та додають 100 мкл специфічного хромогенного субстрату для фактора Ха в придатній концентрації для кількісного визначення (наприклад, N- $\alpha$ -бензилоксикарбоніл-D-аргініл-L-гліцил-L-аргінін-4-нітроанлід дигідрохлориду, розчинений у воді Р для отримання 1 мМ розчину).

Для кінетичного методу переносять суміші до напівмікрокувет та вимірюють зміну оптичної густини за хвилину (2.2.25) за довжини хвилі 405 нм із використанням придатного зчитувального пристрою.

За умови використання методу кінцевої точки реакцію зупиняють чітко через 4 хв додаванням  $\blacktriangledown$  50 мкл  $\blacktriangle$  20 % (об/об) розчину оцтової кислоти льодяної Р. Оцінюють, чи дає саме інкубація з хромогенним субстратом протягом 4 хв оптимальне зчитування оптичної густини, та, за необхідності, доводять час інкубації до результатів, що дають найкращу криву «доза-відповідь». Потім переносять суміш до напівмікрокувет та вимірюють оптичну густину (2.2.25) за довжини хвилі 405 нм із використанням придатного зчитувального пристрою.

За тих самих умов проводять контрольний дослід (холосту пробу) із визначенням амідолітичної активності на початку та наприкінці випробування, використовуючи замість стандартних та випробовуваних розчинів *трис(гідроксиметил)амінометан-ЕДТА буферний розчин рН 8.4 Р1*; 2 одержаних значення не мають значно відрізнятись.

Обчислюють лінійну залежність оптичної густини від  $\log$  концентрацій розчинів випробовуваного зразка та БСП гепарину натрію, обчислюють активність випробовуваного зразка в МО/мл, використовуючи звичайні статистичні методи аналізу з використанням моделі паралельних ліній (5.3).

### 2.7.8. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ПРАВЦЯ (АДСОРБОВАНОЇ)

Активність вакцини для профілактики правця визначають введенням вакцини тваринам (мурчакам та мишам) після їх контрольного (провокаційного) зараження правцевим токсином (метод А або В) або визначенням титру антитіл до правцевого анатоксину в сироватці мурчаків (метод С). У всіх випадках активність вакцини обчислюють відносно стандартного препарату, каліброваного в Міжнародних одиницях (МО). Для методів А та В в країнах, де метод паралічу не є обов'язковим, може використовуватись метод  $LD_{50}$ . Для методу  $LD_{50}$  кількість тварин та методики ідентичні тим, що описані для

методу паралічу, але за кінцеву точку беруть замість паралічу загибель тварин.

МО — активність, що міститься у зазначеній кількості міжнародного стандарту  $\blacksquare$  правцевого анатоксину (адсорбованого). Еквівалент МО міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня організація охорони здоров'я.

БСП вакцини для профілактики правця (адсорбованої) калібруваний у МО відносно до міжнародного стандарту.

Підбір методу кількісного визначення вакцини для профілактики правця (адсорбованої) залежить від призначення. Метод А або В використовують:

1.  $\blacktriangledown$  для кількісного визначення виготовлених серій під час розробки вакцини для валідації виробництва  $\blacktriangle$ ;
2. якщо необхідно провести повторну валідацію через значні зміни виробничих процесів.

Методи А або В можуть також використовуватись для рутинного кількісного визначення  $\blacktriangledown$  серій  $\blacktriangle$  вакцин, але з метою збереження тварин, по можливості, потрібно застосовувати метод С.

Метод С може застосовуватись, крім випадків, зазначених вище в пунктах 1 та 2, після перевірки придатності методу для лікарського засобу. Для цих цілей відповідну кількість  $\blacktriangledown$  серій  $\blacktriangle$  (звичай 3) аналізують методом С та методами А або В. У тих випадках, коли різні вакцини (моновалентні або комбіновані) готують із правцевого анатоксину одного походження та з порівняним рівнем (що відображено в Лf/мл) того самого правцевого анатоксину, придатність, продемонстрована для комбінації з найбільшою кількістю компонентів, може вважатись дійсною для комбінації з меншою кількістю компонентів та для моновалентних вакцин. Будь-які комбінації, що містять такий компонент, як цілюноклітинний кашлюк, або вакцину для профілактики інфекцій, викликаних *Hemophilus* типу b (кон'юговану) з правцевим анатоксином в одному флаконі, мають оцінюватись окремо.

Для комбінацій, що містять дифтерійний та правцевий компоненти, серологічний аналіз (метод С) може проводитись на тій же групі тварин, досліджених при серологічному аналізі вакцини для профілактики дифтерії (адсорбованої) (2.7.6), якщо підтверджено, що звичайні умови імунізації для компонентів дифтерії та правця (наприклад, дози, тривалість) дійсні для комбінованих вакцин.

Під час розробки методів кількісних визначень, наведених нижче, використовують  $\blacktriangledown$  багаторазові  $\blacktriangle$  розведення випробовуваного та стандартного препарату.  $\blacksquare$   $\blacktriangledown$  На основі даних про активність, отриманих у кількісних визначеннях із використанням багаторазових розведень, можна зменшити кількість тварин, необхідних для отримання статистично значущого результату  $\blacktriangle$ , можливе застосування