

## Номер. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КОКЛЮША ЦЕЛНОКЛЕТОЧНОЙ

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на биологический метод определения активности вакцины для профилактики коклюша цельноклеточной путём сравнения дозы, необходимой для защиты мышей от эффектов летальной дозы *Bordetella pertussis* при интрацеребральном введении, с количеством стандартного образца, калиброванного в международных единицах (МЕ), необходимым для обеспечения того же уровня защиты.

За международную единицу принимают активность определенного количества международного стандартного образца, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения. Международный стандартный образец представляет собой лиофилизированную вакцину для профилактики коклюша цельноклеточную.

### **Выбор и распределение животных.**

В испытании используют здоровых мышей подходящей линии из одной партии (стока), возрастом менее пяти недель. Разница в массе между самой тяжёлой и самой лёгкой мышью не должна превышать 5 г. Животных распределяют на шесть групп, состоящих из не менее, чем по 16 особей (опытные группы) и четыре группы по 10 особей (контрольные группы). Все мыши в испытании должны быть одного пола, либо самцы и самки должны быть распределены поровну между группами.

### **Выбор тест-штамма и приготовление рабочей суспензии**

Выбирают подходящий тест-штамм *B. pertussis*, способный вызывать гибель мышей в течение 14 сут после интрацеребрального введения. Штамм считают неподходящим, если более 20 % мышей погибают в течение 48 ч после интрацеребрального введения.

Выполняют субкультивирование штамма и суспендируют собранные клетки *B. pertussis* в растворе, содержащем 10 г/л гидролизата казеина Р и 6 г/л натрия хлорида Р, со значением рН 7,0–7,2, либо в другом подходящем растворе. Определяют мутность суспензии (номер). Готовят серию разведений в том же растворе и распределяют каждое разведение на отдельную контрольную группу мышей. Вводят интрацеребрально каждой мыши дозу (0,02 мл или 0,03 мл) разведения, предназначенного для данной группы. Через 14 сут подсчитывают количество выживших мышей в каждой группе и рассчитывают ожидаемую концентрацию клеток микроорганизма в суспензии (степень мутности суспензии), содержащей 100 LD<sub>50</sub> в дозе рабочей суспензии.

Для проведения испытания вакцины из субкультуры того же штамма *B. pertussis* готовят рабочую суспензию с мутностью, соответствующей примерно 100 LD<sub>50</sub> в каждой дозе. Из рабочей суспензии готовят 3 разведения.

### **Определение активности**

Готовят 3 последовательных разведения испытуемого образца и 3 аналогичных разведения стандартного образца таким образом, чтобы в промежуточном разведении можно ожидать защиты около 50 % мышей от летального действия заражающей дозы *B. pertussis*. Для испытуемого образца могут быть использованы дозы, соответствующие 1/8, 1/40 и 1/200 от дозы, рекомендованной к применению, и дозы стандартного образца, равные 0,5 МЕ, 0,1 МЕ и 0,02 МЕ, причём каждая доза содержится в объёме, не превышающем 0,5 мл. Распределяют 6 разведений (три разведения испытуемого образца и три разведения стандартного образца) по одному на каждую опытную группу и вводят внутривентрально каждой мыши по одной дозе разведения, предназначенного для её группы.

Через 14–17 сут интрацеребрально вводят каждому животному в опытных группах дозу рабочей суспензии. Распределяют рабочую суспензию и три разведения из неё на каждую из контрольных групп мышей, и вводят интрацеребрально каждой мыши в группе соответствующую дозу. Исключают из рассмотрения мышей, которые умирают в течение 48–72 ч после заражения. Подсчитывают количество мышей, выживших в каждой из групп через 14 сут. Рассчитывают активность испытуемого образца относительно активности стандартного образца на основе количества выживших животных в каждой из опытных групп.

Результаты испытания являются достоверными, если:

- как для испытуемого образца, так и для стандартного образца PD<sub>50</sub> находится между наибольшей и наименьшей дозами, вводимыми мышам;
- количество погибших животных в контрольных группах, которым вводили рабочую суспензию и разведения из неё, подтверждает дозу примерно в 100 LD<sub>50</sub>;
- статистический анализ подтверждает отсутствие отклонений от линейности или параллельности.

Испытание может быть проведено повторно, но если оно проводится более одного раза, достоверные результаты всех испытаний должны быть объединены.

*Следующий раздел приводится для информации.*

Пример методики количественного определения вакцины для профилактики коклюша цельноклеточной с использованием штамма *B. pertussis* 18323 и мышей линии F1 CBA×C57Bl/6j.

**Выбор и распределение животных.** В испытании используют здоровых мышей линии F1 CBA×C57Bl/6j из одной партии (стока) с массой тела от 10 до 12 г.

Формируют шесть групп по 19 мышей в каждой (опытные группы) и одновременно для контроля рабочей суспензии из этой же партии (стока) формируют четыре группы по 10 мышей в каждой (контрольные группы).

#### **Приготовление питательных сред**

*Фильтрат картофельного отвара.* В 1000 мл воды *P* вносят 500 г очищенного мелко нарезанного картофеля и нагревают до кипения. В момент закипания добавляют 40 мл глицерина. Кипятят в закрытой посуде до полного разваривания картофеля в течение 1,0–1,5 ч. Доводят объем отвара водой *P* до 1000 мл и процеживают через двухслойную марлевую салфетку. Используют свежеприготовленным.

#### *Среда Борде-Жангу*

Последовательно растворяют в 1500 мл воды *P* 2,25 г калия дигидрофосфата *P*, 0,75 г дикалия гидрофосфата *P*, 1,5 г калия хлорида *P*, 0,075 г магния сульфата *P* и 7,5 г натрия хлорида *P*, при необходимости доводят хлороводородной кислотой *P* или натрия гидроксида раствором разбавленным *P* до значения pH 7,4–7,5 (2.1.2.3). Прибавляют 500 мл фильтрата картофельного отвара и 60 г агара микробиологического. Среду нагревают до полного растворения агара, при необходимости доводят хлороводородной кислотой *P* или натрия гидроксида раствором разбавленным *P* до значения pH 7,1–7,2 (2.1.2.3), разливают по 200 мл в стерильные флаконы вместимостью 500 мл, стерилизуют при температуре 110 °С в течение 30 мин и хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более трех месяцев. Перед применением нагревают до температуры 50–55 °С, прибавляют 60 мл дефибринированной крови (например, овечьей), перемешивают и разливают в чашки Петри. Срок хранения среды в чашках Петри не более 14 сут при температуре от 2 °С до 8 °С.

#### *Гидролизат казеина*

- |                           |           |
|---------------------------|-----------|
| • Казеин                  | 2000,0 г  |
| • Хлороводородная кислота | 1000,0 мл |
| • Вода                    | 500,0 мл  |

#### *Дрожжевой диализат*

- |                        |          |
|------------------------|----------|
| • Дрожжи хлебопекарные | 1000,0 г |
| • Хлороформ            | 4,0 мл   |

|                                          |              |
|------------------------------------------|--------------|
| • Вода                                   | 1000,0 мл    |
| <i>Казеиново-угольный агар</i>           |              |
| • Гидролизат казеина                     | 170 мл       |
| • Дрожжевой диализат                     | 90 мл        |
| • Дикалиягидрофосфат                     | 0,5 г        |
| • Магния хлорид                          | 0,4 г        |
| • Крахмал растворимый                    | 1,5 г        |
| • Кальция хлорид                         | 0,01 г       |
| или раствор кальция хлорида (10 г/л)     | 1,0 мл       |
| • Железа (II) сульфат                    | 0,01 г       |
| или раствор железа (II) сульфата (5 г/л) | 2,0 мл       |
| • Меди сульфата пентагидрат              | 0,005 г      |
| или раствор меди сульфата (2 г/л)        | 2,0 мл       |
| • L-цистеин                              | 0,03 г       |
| или раствор L-цистеина (15 г/л)          | 2 мл         |
| • Агар микробиологический                | 30,0 г       |
| • Уголь активированный                   | 2,0 г        |
| • Вода                                   | до 1000,0 мл |

Среду нагревают до полного растворения агара, при необходимости доводят хлороводородной кислотой *P* или натрия гидроксида раствором разбавленным *P* до значения pH 7,0–7,1 (2.1.2.3), разливают по 200 мл в стерильные флаконы вместимостью 500 мл. стерилизуют при температуре 110 °С в течение 30 мин и хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более одного месяца. Перед применением нагревают до температуры 50–55 °С, вносят 20 мл дефибринированной крови (например, овечьей), перемешивают и разливают в чашки Петри. Срок хранения среды в чашках Петри не более 14 сут при температуре от 2 °С до 8 °С.

Допустимо применение соответствующих коммерчески доступных питательных сред.

#### **Приготовление рабочей суспензии**

Суспензию штамма *B. pertussis* 18323 получают из 20–24-часовой субкультуры второго (если иное не обосновано) пассажа на подходящей питательной среде (среда Борде-Жангу или казеиново-угольный агар).

Проводят микроскопию мазков, окрашенных по Граму; клетки *B. pertussis* должны быть морфологически однородны, без посторонней микрофлоры.

С использованием стерильного раствора 9 г/л натрия хлорида *P* готовят суспензию бактериальных клеток с мутностью 5 МЕ (номер *Определение концентрации клеток микроорганизмов*), которая содержит около  $5 \times 10^9$  колониеобразующих единиц (КОЕ) в мл, (исходная суспензия). Дальнейшие разведения суспензии делают в растворе, содержащем 10 г/л гидролизата казеина *P* и 6 г/л натрия хлорида *P* и имеющем значение pH 6,9–7,3.

Исходную суспензию разводят последовательными шагами так, чтобы получить рабочую суспензию с заражающей дозой, содержащей около 7 000 микробных клеток в объеме 0,03 мл (не менее 100 LD<sub>50</sub>). Рабочую суспензию последовательно разводят в 10, 50, 250 и 1250 раз для определения LD<sub>50</sub> штамма *B. pertussis* 18323 и проверки жизнеспособности клеток микроорганизма в суспензии (табл. номер-1).

Таблица номер-1.- Примерная схема разведения тест-штамма *B. pertussis* 18323

| Кратность разведения | Кратность разведения (от предыдущей пробирки) | Объем суспензии бактериальных клеток из предыдущей пробирки, мл | Объем растворителя, мл | Количество бактериальных клеток, КОЕ в 0,03 мл (расчетное) | Назначение                              |
|----------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 7*                   | 7                                             | 1                                                               | 6                      | $2 \times 10^7$                                            | -                                       |
| 21*                  | 3                                             | 1                                                               | 2                      | $7 \times 10^6$                                            | -                                       |
| 210*                 | 10                                            | 0,5                                                             | 4,5                    | $7 \times 10^5$                                            | -                                       |
| 2100*                | 10                                            | 0,5                                                             | 4,5                    | $7 \times 10^4$                                            | -                                       |
| 21000*               | 10                                            | 2                                                               | 18                     | $7 \times 10^3$                                            | Для заражения (рабочая суспензия)       |
| 10**                 | 10                                            | 0,5                                                             | 4,5                    | 700                                                        | Для определения LD <sub>50</sub> штамма |
| 50**                 | 5                                             | 1,0                                                             | 4,0                    | 140                                                        |                                         |
| 250**                | 5                                             | 1,0                                                             | 4,0                    | 30                                                         |                                         |
| 1250**               | 5                                             | 1,0                                                             | 4,0                    | 6                                                          |                                         |

Примечания.

\* - кратность разведения от исходной суспензии.

\*\* - кратность разведения от рабочей суспензии

Сразу после приготовления, разведение в 1250 раз высевают по 0,1 мл на три чашки Петри со средой Борде-Жангу или казеиново-угольным агаром. Культуру инкубируют в термостате при температуре 36 °С в течение 3–4 сут. Для определения количества КОЕ в 0,03 мл суспензии проводят подсчет колоний на трех чашках Петри и делят полученное значение на 10.

В 0,03 мл суспензии в разведении в 1250 должно быть не более 20 КОЕ.

#### Определение активности.

Восстанавливают стандартный образец стерильным раствором 9 г/л *натрия хлорида* Р до получения концентрации 1,56 МЕ/мл (разведение I). Из разведения I делают два последующих пятикратных разведения (разведения II и III).

В качестве стандартного образца может быть использован *ФСО ЕАЭС иммуногенной активности вакцины для профилактики коклюша цельноклеточной*, калиброванный в международных единицах.

Испытуемый образец разводят стерильным раствором 9 г/л *натрия хлорида Р*, например, в 5 раз (разведение I). Из разведения I делают два последующих пятикратных разведения (разведения II и III).

Если полученное в опыте значение  $PD_{50}$  испытуемого образца или стандартного образца не будет соответствовать критерию достоверности результатов испытания (находится между наибольшей и наименьшей дозами, вводимыми мышам), то корректируют разведение I.

Разведения испытуемого образца и стандартного образца хранят при температуре от 2 до 8 °С и используют в течение не более 4 ч.

Распределяют полученные разведения по одному на каждую опытную группу и вводят внутривентриально по 0,5 мл каждой мыши по одной дозе разведения, предназначенного для ее группы. К моменту введения рабочей суспензии не менее 94 % иммунизированных мышей должно остаться в живых без признаков заболевания. Если гибель животных превышает указанную величину, то испытание не учитывают.

Через 14–17 дней каждому животному в опытных группах вводят интрацеребрально по 0,03 мл рабочей суспензии путём прокола лобной кости в точке, расположенной в 2 мм от средней линии и на 2 мм выше глаза. Для подтверждения величины  $LD_{50}$  разведения рабочей суспензии в 10, 50, 250 и 1250 раз вводят мышам в контрольных группах интрацеребрально по 0,03 мл.

Мышей, погибших в течение первых трех суток после заражения, исключают из опыта (неспецифическая гибель); в каждой опытной группе оставляют по 16 мышей. За заражёнными животными наблюдают 14 сут с ежедневной регистрацией их гибели. В день учёта результатов на 14 сут в число погибших включают также всех парализованных мышей.

Вычисление величины  $LD_{50}$  рабочей суспензии производят с учетом результатов, полученных для суспензии, разведенной в 10, 50, 250 и 1250 раз, по формуле Кербера:

$$\lg LD_{50} = \lg D_N - \delta(\sum L_i - 0,5),$$

где  $D_N$  — максимальная доза суспензии штамма *B. pertussis*, КОЕ в 0,03 мл;

$\delta$  — логарифм кратности разведения (отношение большей дозы к следующей за ней меньшей дозе);

$L_i$  — отношение количества погибших и парализованных животных при

введении данной дозы суспензии штамма *B. pertussis* к общему числу животных, которым эта доза была введена;

$\sum L_i$  – сумма значений  $L_i$ , рассчитанных для всех доз суспензии штамма *B. pertussis*.

Таблица номер-2 - Расчет величины  $LD_{50}$  рабочей суспензии штамма *B. pertussis* 18323.

| Количество бактериальных клеток, КОЕ в 0,03 мл (расчетное) | Количество заражённых животных | Количество погибших и парализованных из общего числа заражённых животных | $L_i$ | $LD_{50}$ | Количество бактериальных клеток в разведении в 1250 раз, КОЕ в 0,03 мл (фактическое) |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 700                                                        | 10                             | 10/10                                                                    | 1,0   | 28        | 2                                                                                    |
| 140                                                        | 10                             | 8/10                                                                     | 0,8   |           |                                                                                      |
| 30                                                         | 10                             | 5/10                                                                     | 0,5   |           |                                                                                      |
| 6                                                          | 10                             | 2/10                                                                     | 0,2   |           |                                                                                      |

$$\sum L_i = 2,5$$

$$\lg LD_{50} = \lg 700 - \lg 5 \cdot (2,5 - 0,5) = 2,8451 - 0,6990 \cdot 2,0 = 1,4471$$

$LD_{50} = 28$  бактериальных клеток.

В рабочей суспензии ( $7 \times 10^3$  бактериальных клеток) содержится 250  $LD_{50}$ .

Расчет активности испытуемого образца проводят по методу Вильсона и Вустера, с помощью программы Probit-analysis или любым другим подходящим методом.

Для проведения расчета по методу Вильсона-Вустера используют таблицу (таблица номер-3), применимую к испытаниям с тремя дозами образца, различающихся пятикратными шагами разведений, по 16 животных для каждой дозы. По вертикали указаны величины, равные сумме выживших мышей от всех трёх доз образца (А), по горизонтали – разница между количеством мышей, выживших от наибольшей и наименьшей доз образца (В). Табличные данные, располагающиеся на пересечении строк соответствующих величин А и В, содержат информацию о расчетной  $PD_{50}$  для условной дозы образца, равной 100, и её стандартных отклонениях, выраженных в процентах.

Таблица номер-3 - Таблица данных для расчета  $PD_{50}$  по методу Вильсона-Вустера

|    |                |                 |                |                 |                |      |
|----|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|------|
| 41 | 10,1<br>48-208 | 14,5<br>66-154  |                |                 |                |      |
| 40 | 9,4<br>42-236  | 13,6<br>58-172  | 17,2<br>71-140 |                 |                |      |
| 39 | 9,4<br>38-260  | 13,4<br>53-187  | 17,0<br>66-153 | 20,3<br>76-133  |                |      |
| 38 | 9,5<br>36-276  | 13,75<br>50-199 | 17,6<br>62-163 | 20,75<br>71-142 | 23,1<br>78-128 |      |
| 37 | 10,2           | 14,5            | 18,5           | 21,7            | 24,3           | 25,9 |

|    |                  |                  |                  |                  |                 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |  |
|----|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--|
|    | 35-288           | 48-208           | 59-170           | 67-148           | 74-134          | 80-125           |                  |                  |                  |                  |                  |                  |  |
| 36 | 11,3<br>34-295   | 15,5<br>47-213   | 19,7<br>57-175   | 23,1<br>65-154   | 25,9<br>71-140  | 28,0<br>76-131   | 29,0<br>81-124   |                  |                  |                  |                  |                  |  |
| 35 | 12,3<br>34-296   | 17,0<br>46-217   | 21,3<br>56-178   | 25,1<br>64-157   | 28,0<br>70-144  | 29,9<br>74-135   | 31,4<br>78-128   | 32,9<br>81-124   |                  |                  |                  |                  |  |
| 34 | 14,0<br>34-294   | 19,0<br>46-218   | 23,5<br>55-181   | 27,25<br>63-160  | 30,4<br>68-147  | 32,9<br>73-137   | 34,6<br>76-131   | 35,7<br>79-126   | 39,9<br>81-124   |                  |                  |                  |  |
| 33 | 16,5<br>35-288   | 21,7<br>46-217   | 26,3<br>55-181   | 29,9<br>62-161   | 33,5<br>67-149  | 35,7<br>72-140   | 38,1<br>75-133   | 39,3<br>78-129   | 40,6<br>80-125   |                  |                  |                  |  |
| 32 | 19,4<br>36-279   | 25,1<br>47-214   | 29,4<br>55-181   | 33,5<br>62-162   | 36,8<br>67-150  | 39,3<br>71-141   | 41,9<br>74-134   | 43,25<br>77-131  | 44,0<br>79-127   | 47,7<br>81-124   |                  |                  |  |
| 31 | 23,1<br>37-268   | 29,0<br>48-210   | 34,0<br>56-180   | 38,1<br>62-162   | 41,3<br>67-150  | 44,0<br>70-143   | 46,2<br>73-136   | 47,75<br>76-132  | 48,5<br>78-128   | 50,0<br>80-125   |                  |                  |  |
| 30 | 28,0<br>39-258   | 34,0<br>49-205   | 38,7<br>56-178   | 43,3<br>62-162   | 46,2<br>66-151  | 49,25<br>70-143  | 50,9<br>73-136   | 52,5<br>75-134   | 53,5<br>77-130   | 55,1<br>79-126   | 59,7<br>81-123   | 61,7<br>82-121   |  |
| 29 | 34,0<br>41-244   | 39,9<br>50-201   | 44,7<br>57-176   | 49,25<br>62-161  | 52,5<br>66-151  | 55,1<br>70-144   | 56,9<br>72-139   | 57,8<br>75-134   | 59,7<br>77-130   | 60,7<br>79-126   | 62,75<br>81-123  | 64,8<br>82-121   |  |
| 28 | 41,9<br>43-233   | 47,7<br>50-196   | 52,5<br>57-174   | 56,0<br>62-161   | 58,8<br>66-151  | 61,7<br>70-144   | 63,7<br>72-139   | 64,8<br>75-134   | 65,8<br>77-131   | 66,9<br>79-127   | 69,1<br>81-123   | 71,3<br>82-121   |  |
| 27 | 51,7<br>43-224   | 56,9<br>52-192   | 61,7<br>58-173   | 64,6<br>63-160   | 66,9<br>66-151  | 69,1<br>70-144   | 71,3<br>72-139   | 72,5<br>74-135   | 72,5<br>76-131   | 73,6<br>79-128   | 74,8<br>81-123   | 76,41<br>82-121  |  |
| 26 | 64,8<br>46-217   | 69,1<br>53-188   | 72,5<br>58-171   | 74,8<br>63-160   | 76,1<br>67-150  | 78,6<br>70-144   | 79,8<br>72-139   | 79,8<br>74-134   | 81,1<br>76-131   | 81,1<br>78-128   | 82,4<br>81-123   | 82,4<br>82-121   |  |
| 25 | 79,8<br>47-211   | 82,4<br>54-187   | 85,1<br>59-170   | 86,5<br>63-159   | 87,9<br>67-150  | 87,9<br>70-144   | 89,25<br>72-139  | 89,25<br>74-134  | 89,25<br>76-131  | 90,8<br>78-128   | 90,8<br>81-123   | 90,8<br>82-121   |  |
| 24 | 100<br>48-211    | 100<br>54-186    | 100<br>59-170    | 100<br>63-159    | 100<br>67-150   | 100<br>70-144    | 100<br>72-139    | 100<br>74-134    | 100<br>77-131    | 100<br>79-127    | 100<br>81-123    | 100<br>83-120    |  |
| 23 | 125,3<br>47-211  | 121,3<br>54-187  | 117,5<br>59-170  | 115,6<br>63-159  | 113,7<br>67-150 | 113,7<br>70-144  | 111,75<br>72-139 | 111,75<br>74-134 | 111,75<br>76-131 | 110,25<br>78-128 | 110,25<br>81-123 | 110,25<br>82-121 |  |
| 22 | 154,4<br>46-217  | 144,8<br>53-188  | 138,0<br>58-172  | 133,6<br>63-160  | 131,5<br>67-150 | 127,3<br>70-144  | 125,3<br>72-139  | 125,3<br>74-134  | 123,3<br>76-131  | 123,3<br>78-128  | 121,3<br>81-123  | 121,3<br>82-121  |  |
| 21 | 193,3<br>45-224  | 175,7<br>52-192  | 162,2<br>58-173  | 154,4<br>63-160  | 149,5<br>66-151 | 144,75<br>70-144 | 140,2<br>72-139  | 138,0<br>74-135  | 138,0<br>76-131  | 135,8<br>79-128  | 133,6<br>81-123  | 131,5<br>82-121  |  |
| 20 | 238,5<br>43-233  | 209,7<br>50-196  | 190,3<br>57-174  | 178,5<br>62-161  | 170,1<br>66-151 | 162,2<br>70-144  | 157,0<br>72-139  | 154,4<br>75-134  | 152,0<br>77-131  | 149,5<br>79-127  | 144,8<br>81-123  | 140,2<br>82-121  |  |
| 19 | 294,0<br>41-244  | 250,3<br>50-201  | 223,6<br>57-176  | 203,0<br>62-161  | 190,3<br>66-151 | 181,4<br>70-144  | 175,7<br>72-139  | 172,9<br>75-134  | 167,4<br>77-130  | 164,7<br>79-126  | 159,5<br>81-123  | 154,4<br>82-121  |  |
| 18 | 356,6<br>39-258  | 294,0<br>49-205  | 258,5<br>56-178  | 231,0<br>62-162  | 216,5<br>66-151 | 203,0<br>70-143  | 196,5<br>73-137  | 190,3<br>75-134  | 187,3<br>77-130  | 181,4<br>79-126  | 167,4<br>81-123  | 162,2<br>82-121  |  |
| 17 | 432,6<br>38-268  | 345,3<br>48-210  | 294,0<br>56-180  | 262,7<br>62-162  | 242,4<br>67-150 | 227,5<br>70-143  | 216,5<br>73-136  | 209,7<br>76-132  | 206,3<br>78-128  | 199,8<br>80-125  |                  |                  |  |
| 16 | 516,5<br>36-279  | 399,1<br>47-214  | 339,8<br>55-181  | 298,7<br>62-162  | 271,2<br>67-150 | 254,6<br>71-141  | 238,5<br>74-134  | 231,0<br>77-131  | 227,5<br>79-127  | 209,7<br>81-124  |                  |                  |  |
| 15 | 606,5<br>35-288  | 461,1<br>46-217  | 380,3<br>55-181  | 334,5<br>62-162  | 298,7<br>67-149 | 280,1<br>72-140  | 262,0<br>75-133  | 254,6<br>78-130  | 246,3<br>80-125  |                  |                  |                  |  |
| 14 | 712,3<br>34-294  | 524,8<br>46-218  | 425,7<br>55-181  | 368,2<br>63-160  | 329,1<br>68-147 | 303,6<br>73-137  | 289,3<br>76-131  | 280,1<br>79-126  | 250,3<br>81-124  |                  |                  |                  |  |
| 13 | 810,4<br>34-296  | 587,4<br>46-217  | 468,8<br>56-178  | 399,25<br>64-157 | 356,6<br>70-144 | 334,5<br>74-135  | 318,75<br>78-128 | 303,6<br>81-124  |                  |                  |                  |                  |  |
| 12 | 908<br>34-295    | 647,6<br>47-213  | 508,6<br>57-175  | 432,6<br>65-154  | 386,5<br>71-140 | 356,6<br>76-131  | 345,3<br>81-124  |                  |                  |                  |                  |                  |  |
| 11 | 983<br>35-288    | 690,6<br>48-208  | 542<br>59-170    | 461,1<br>67-148  | 413,3<br>74-134 | 386,5<br>80-125  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |  |
| 10 | 1048<br>36-276   | 727,3<br>50-199  | 568,75<br>62-163 | 484,2<br>71-142  | 432,6<br>78-128 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |  |
| 9  | 1065<br>38-260   | 747,9<br>53-187  | 587,4<br>66-153  | 492<br>76-133    |                 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |  |
| 8  | 1065<br>42-236   | 737,6<br>58-172  | 578<br>71-140    |                  |                 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |  |
| 7  | 999,25<br>48-208 | 691,25<br>66-153 |                  |                  |                 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |  |
| 6  | 878,5<br>57-176  |                  |                  |                  |                 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |  |
|    | 5                | 6                | 7                | 8                | 9               | 10               | 11               | 12               | 13               | 14               | 15               | 16               |  |

Величину  $PD_{50}$  стандартного образца, выраженную в МЕ, вычисляют по формуле:

$$PD_{50_{ст.}} = \frac{I \times D}{100},$$

где  $I$  — величина  $PD_{50}$ , полученная по таблице для опытной группы животных, получивших среднюю дозу стандартного образца (разведение II);

$D$  — количество МЕ в средней дозе стандартного образца (разведение II).

Нижнюю границу стандартного отклонения для  $PD_{50}$  стандартного образца, выраженную в МЕ, вычисляют по формуле:

$$PD_{50_{ст. min}} = \frac{PD_{50_{ст.}} \times N_{нижн.}}{100},$$

где  $PD_{50_{ст.}}$  — величина  $PD_{50}$  стандартного образца, вычисленная по формуле;

$N_{нижн.}$  — значение нижней границы стандартного отклонения по таблице для группы животных, получивших среднюю дозу стандартного образца (разведение II)

Верхнюю границу стандартного отклонения для  $PD_{50}$  стандартного образца, выраженную в МЕ, вычисляют по формуле:

$$PD_{50_{ст. max}} = \frac{PD_{50_{ст.}} \times N_{верх.}}{100},$$

где  $PD_{50_{ст.}}$  — величина  $PD_{50}$  стандартного образца, вычисленная по формуле;

$N_{верх.}$  — значение верхней границы стандартного отклонения по таблице для группы животных, получивших среднюю дозу стандартного образца (разведение II).

Величину  $PD_{50}$  испытуемого образца, выраженную в мл, вычисляют по формуле:

$$PD_{50_{исп}} = \frac{I \times D}{100},$$

где  $I$  — величина  $PD_{50}$ , полученная по таблице для опытной группы животных, получивших среднюю дозу испытуемого образца (разведение II);

$D$  — количество неразведённого испытуемого образца в средней дозе испытуемого образца (разведение II), мл.

Нижнюю границу стандартного отклонения для  $PD_{50}$  испытуемого образца, выраженную в мл, вычисляют по формуле:

$$PD_{50_{исп. min}} = \frac{PD_{50_{исп}} \times N_{нижн.}}{100},$$

где  $PD_{50_{исп.}}$  — величина  $PD_{50}$  испытуемого образца, вычисленная по формуле;

$N_{нижн.}$  — значение нижней границы стандартного отклонения по таблице для группы животных, получивших среднюю дозу испытуемого образца (разведение II).

Верхнюю границу стандартного отклонения для  $PD_{50}$  испытуемого образца, выраженную в мл, вычисляют по формуле:

$$PD_{50_{испmax}} = \frac{PD_{50_{исп}} \times N_{верх.}}{100},$$

где  $PD_{50_{исп}}$  – величина  $PD_{50}$  испытуемого образца, вычисленная по формуле;

$N_{верх.}$  – значение верхней границы стандартного отклонения по таблице для группы животных, получивших среднюю дозу испытуемого образца (разведение II).

Таблица номер-4 - Расчет  $PD_{50}$  и стандартного отклонения испытуемого образца и стандартного образца

| Образец                                                                                                                    | Количество неразведенного образца в 0,5 мл разведения образца, мл | Количество МЕ в 0,5 мл, разведения образца, вводимого животным | Количество выживших мышей/ общее число зараженных в группе | Величина А/В | PD <sub>50</sub> и стандартное отклонение расчетные (по таблице) | PD <sub>50</sub> и стандартное отклонение фактические (по формуле) |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Стандартный                                                                                                                | -                                                                 | 0,7800                                                         | 13/16                                                      | 16/12        | 231,0                                                            | 0,3604 МЕ                                                          |
|                                                                                                                            |                                                                   | 0,1560                                                         | 2/16                                                       |              | 77-134                                                           | 0,4829-0,2775                                                      |
|                                                                                                                            |                                                                   | 0,0312                                                         | 1/16                                                       |              |                                                                  |                                                                    |
| Испытуемый                                                                                                                 | 0,100                                                             | -                                                              | 12/16                                                      | 17/12        | 209,7                                                            | 0,0419 мл                                                          |
|                                                                                                                            | 0,020                                                             |                                                                | 5/16                                                       |              | 76-132                                                           | 0,0553-0,0318                                                      |
|                                                                                                                            | 0,004                                                             |                                                                | 0/16                                                       |              |                                                                  |                                                                    |
| Примечание – приведен пример расчета PD <sub>50</sub> и стандартного отклонения испытуемого образца и стандартного образца |                                                                   |                                                                |                                                            |              |                                                                  |                                                                    |

Расчет  $PD_{50}$  стандартного образца с использованием данных таблицы номер-4:

$$PD_{50_{см.}} = \frac{231,0 \times 0,1560}{100} = 0,3604 \text{ МЕ},$$

$$PD_{50_{см.min}} = \frac{0,3604 \times 77}{100} = 0,2775 \text{ МЕ},$$

$$PD_{50_{см.max}} = \frac{0,3604 \times 134}{100} = 0,4829 \text{ МЕ},$$

Расчет  $PD_{50}$  испытуемого образца с использованием данных таблицы номер-4:

$$PD_{50_{исп}} = \frac{209,7 \times 0,020}{100} = 0,0419 \text{ мл},$$

$$PD_{50_{исп min}} = \frac{0,0419 \times 76}{100} = 0,0318 \text{ мл},$$

$$PD_{50_{исп max}} = \frac{0,0419 \times 132}{100} = 0,0553 \text{ мл}.$$

Активность испытуемого образца в МЕ/мл вычисляют по формуле:

$$R = \frac{PD_{50_{cm.}}}{PD_{50_{исп}}},$$

где  $PD_{50_{cm.}}$  – фактическая  $PD_{50}$  стандартного образца (вычисленная по формуле);

$PD_{50_{исп}}$  – фактическая  $PD_{50}$  испытуемого образца (вычисленная по формуле).

Нижний предел доверительного интервала ( $R_{min}$ ) и верхний предел доверительного интервала ( $R_{max}$ ) в МЕ/мл вычисляют по формулам:

$$R_{min} = \frac{R}{K};$$

$$R_{max} = R \times K,$$

где  $R$  – активность испытуемого образца (вычисленная по формуле), МЕ/мл

$K$  – доверительный коэффициент.

Доверительный коэффициент вычисляют по формуле:

$$K = \text{antilg} \sqrt{(S_1^2 + S_2^2)},$$

$$\text{где: } S_1 = \lg PD_{50_{испmax}} - \lg PD_{50_{исп}},$$

$$S_2 = \lg PD_{50_{исп}} - \lg PD_{50_{испmin}}$$

Расчет активности испытуемого образца и доверительных интервалов с использованием данных таблицы номер-4:

$$R = \frac{0,3604}{0,0419} = 8,6 \text{ МЕ/мл.}$$

$$\begin{aligned} K &= \text{antilg} \sqrt{(-0,3161 - (-0,4432))^2 + (-1,3778 - (-1,4976))^2} \\ &= \text{antilg} \sqrt{0,0162 + 0,0144} = \text{antilg} \sqrt{0,0306} = \text{antilg} 0,1749 = 1,5. \end{aligned}$$

$$R_{min} = \frac{8,6}{1,5} = 5,7 \text{ МЕ/мл.}$$

$$R_{max} = 8,6 \times 1,5 = 12,9 \text{ МЕ/мл.}$$

Активность вакцины составляет 8,6 МЕ/мл с доверительным интервалом от

5,7 МЕ/мл до 12,9 МЕ/мл.