

## **2.7.35. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ ВАКЦИН МЕТОДОМ ИММУНОНЕФЕЛОМЕТРИИ**

Метод нефелометрии описан в общей фармакопейной статье 2.1.2.1. *Прозрачность и степень опалесценции жидкостей*. Методом иммунонефелометрии измеряют мутность, обусловленную формированием иммунного комплекса при реакции «антиген-антитело». Данный метод применяют как для определения количества антител, так и для определения количества антигенов. В настоящей общей фармакопейной статье описано количественное определение антигенов как компонентов вакцин.

### **ОБОРУДОВАНИЕ**

Для испытаний используют нефелометр, описанный в общей фармакопейной статье 2.1.2.1. *Прозрачность и степень опалесценции жидкостей*. Допускается проведение измерения под ненулевым углом, отличным от 90°.

### **МЕТОДЫ**

Измерение светорассеяния в процессе реакции может быть представлено в 3 этапа.

Сначала определяют базовый уровень светорассеяния реакционной средой. После добавления первого реактива (антигена) наблюдается увеличение сигнала с последующим плато. Когда добавляется второй реактив (антитело), наблюдается второе усиление сигнала со вторым плато, за которым следует окончательное увеличение интенсивности сигнала, продолжающегося до тех пор, пока не достигается третье плато. Зону измерения фиксируют с момента добавления второго реактива до достижения наиболее высокой интенсивности светорассеяния (третье плато) в зависимости от концентрации определяемого компонента.

Для количественной оценки иммунных комплексов, образующихся при реакции «антиген-антитело», используют следующие методы.

### ***ИММУНОНЕФЕЛОМЕТРИЯ В КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ***

Методом иммунонефелометрии в конечной точке измеряют светорассеяние после формирования иммунного комплекса, примерно через 60 мин. Измеренное значение в конечной точке в этом случае прямо пропорционально содержанию определяемого компонента в присутствии избытка антител. Проводят контрольный опыт, чтобы учесть значение неспецифического светорассеяния, обусловленного реакционной средой и реакционной измерительной кюветой.

### *КИНЕТИЧЕСКАЯ ИММУНОНЕФЕЛОМЕТРИЯ*

Метод кинетической иммунонефелометрии основан на определении скорости образования иммунных комплексов (скорость увеличения светорассеяния), которая пропорциональна концентрации определяемого компонента.

Существует 2 типа кинетической иммунонефелометрии.

**Иммунонефелометрия с фиксированным временем.** Первое измерение светорассеяния проводят через несколько секунд после добавления последнего реактива. Второе измерение проводят через фиксированный интервал времени, установленный при разработке методики. Разница между двумя значениями пропорциональна количеству определяемого компонента.

**Кинетическая иммунонефелометрия с использованием пика первой производной.** Формирование иммунного комплекса описывает кривая, построенная по первой производной изменения светорассеяния во времени ( $d\Theta_D/dt$ ). Появление двух последовательных пиков обусловлено добавлением первого, а затем второго реактива.

Высота третьего пика кривой, построенной по первой производной, пропорциональна количеству определяемого компонента в реакционной среде. Последовательные измерения проводят через несколько секунд после добавления второго реактива.

В этом случае свет, рассеянный реакционной средой, компонентом и реактивом, не влияет на исходное значение полученного сигнала.

### РЕАКТИВЫ И СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Реактивы, разбавители и стандартные образцы должны быть прозрачными и не содержать взвешенных частиц. При необходимости их предварительно фильтруют или центрифугируют.

Антисыворотки или антитела выбирают на основе их специфичности, способности к осаждению и их авидности по отношению к антигену, высокое значение которой обеспечивает быстрое появление четких сигналов, что улучшает качество результатов.

Кроме того, необходимо установить диапазон концентраций антигена, определяемого в присутствии избытка антител, а также убедиться в отсутствии зонального эффекта в этом диапазоне.

Рекомендуется убедиться, что профили отклика будут аналогичны профилям соответствующего стандартного образца.

### ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ИСПЫТУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

При необходимости проводят соответствующую предварительную обработку испытуемого образца для удаления адьюванта или другого мешающего вещества.

### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Необходимо убедиться, что все реактивы имеют подходящую температуру для оптимального протекания реакции. Образцы разводят подходящей средой в реакционной измерительной кювете, затем добавляют фиксированное количество антител. Выполняют несколько измерений испытуемого разведения.

В некоторых случаях ход реакции можно улучшить путем введения в реакционную среду дополнительных веществ (например, полиэтиленгликоля).

Стандартные и испытуемые образцы обрабатывают одинаковым образом.

### ПРОВЕДЕНИЕ КОНТРОЛЬНОГО ОПЫТА

Для обеспечения специфичности испытания, измеряют только светорассеяние, обусловленное иммунными комплексами. Если другие частицы, матрица образца, реактивы или реакционная измерительная кювета могут мешать испытанию, то таких случаях и в случае использования метода иммунонефелометрии в конечной точке проводят контрольный опыт для исключения неспецифического светорассеяния.

### КАЛИБРОВКА

Калибровочную кривую строят с учетом разведений стандартного образца. Концентрации подбирают таким образом, чтобы охватить рабочий диапазон.

### МЕТОДЫ РАСЧЕТА

Для расчетов используют метод параллельных линий (общая фармакопейная статья 2.3.11. *Статистическая обработка результатов биологических испытаний лекарственных средств*) или метод калибровочной кривой.

### КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ

#### *КАЛИБРОВОЧНЫЕ КРИВЫЕ*

Калибровочные кривые должны соответствовать установленным критериям приемлемости.

Для установления критериев приемлемости могут быть использованы следующие параметры:

- минимальное светорассеяние, выраженное в единицах светорассеяния (*light scattering units*; далее – *LSU*), для точки калибровочной кривой с самой низкой концентрацией;
- коэффициент вариации *LSU*, измеренный для каждой точки кривой;
- коэффициенты регрессии или корреляции калибровочной кривой;
- наклон калибровочной кривой и отрезок, отсекаемый калибровочной кривой на оси координат.

### *РЕЗУЛЬТАТЫ*

Примеры критериев приемлемости, которые следует оценивать:

- коэффициент вариации или диапазон значений для результатов измерений испытуемого образца;
- результаты испытания стандартного образца предприятия с учетом тенденций или контрольной карты.