

Современное состояние методов оценки безопасности и эффективности дифтерийного и столбнячного компонентов комбинированных вакцин

Е. И. Комаровская*, О. В. Перелыгина

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Резюме

Актуальность. Разработка и внедрение методов оценки эффективности (иммуногенности) и безопасности дифтерийного и столбнячного анатоксинов, входящих в состав комбинированных вакцин в календарях профилактических прививок, интенсивно проводившиеся в 1920–1970 гг., в настоящее время снова приобрели актуальность. В последние десятилетия производители вакцин, следуя концепции 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement – замена, сокращение, усовершенствование) проводят исследования по усовершенствованию существующих методов. В отношении определения иммуногенности вакцин внимание исследователей направлено на внедрение методов, исключающих оценку устойчивости иммунизированных животных к введению летальных доз токсинов («золотой стандарт»), а также уменьшению количества животных в испытаниях. При оценке безопасности вакцин некоторые производители считают достаточно убедительными испытания, проведенные на определенных стадиях процесса производства, и исключают проверку конечного продукта на безопасность. **Цель обзора.** Провести сравнительный анализ современных методов контроля безопасности и эффективности (специфической активности) дифтерийного и столбнячного анатоксинов. **Выводы.** Анализ нормативных документов и руководств, касающихся оценки безопасности и методов определения иммуногенности дифтерийного и столбнячного анатоксинов на всех стадиях производства, Всемирной организации здравоохранения, Евросоюза, США и Японии показал, что в Российской Федерации действуют требования, аналогичные международным. Более того, в отношении методов для выявления реверсии токсичности применяют наиболее чувствительные методы и более жесткие критерии приемлемости опыта. Сопоставление характеристик различных методов позволяет сделать заключение о необходимости гармонизации отечественных и международных методов оценки безопасности и иммуногенности дифтерийного и столбнячного анатоксинов, что даст возможность не только облегчить регистрацию зарубежных вакцин в России, но и ускорить регистрацию отечественных вакцин в других странах.

Ключевые слова: специфическая безопасность, реверсия токсичности, дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин, иммуногенность, специфическая активность
Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Комаровская Е. И., Перелыгина О. В. Современное состояние методов оценки безопасности и эффективности дифтерийного и столбнячного компонентов комбинированных вакцин. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2022;21(3): 96–106. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-3-96-106>

Current State of Methods for Control the Safety and Potency of Diphtheria Toxoid and Tetanus Toxoid in Combined Vaccines

EI Komarovskaya**, OV Perelegyna

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia

Abstract

Relevance. Diphtheria toxoid (DT) and tetanus toxoid (TT) manufacturing appears as many steps process. On every stage of proceeding vaccine the control of critical points is being provided. The Parke Williams 8 strain of *Corynebacterium diphtheriae* used in Russia for producing DT, *Clostridium tetani* strain Harvard – for TT. Each culture's supernatant proceed being estimated in relevance of toxoid potency via in vivo and/or in vitro methods. To produce DT, the activity of the toxoid must be not less than 50 Lf/ml and 40 Lf/ml for TT. Toxoids must fit in the main safety conditions – absence of toxin and reversion to toxicity impossibility. In accordance with WHO recommendations, five guinea pigs are injected subcutaneously with at least 500 Lf/ml of purified diphtheria toxoid,

* Для переписки: Комаровская Елена Игоревна, ведущий эксперт лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2. +7 (499) 190-18-18 (64-08), Komarovskaya@expmed.ru. ©Комаровская Е. И. и др.

** For correspondence: Komarovskaya Elena I., Leading Expert of the Laboratory for Toxoids and Antitoxic Sera, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8, Petrovsky Boulevard, building 2, Moscow, 127051, Russian Federation. +7 (499) 190-18-18, add. 6408, Komarovskaya@expmed.ru ©Komarovskaya EI, et al.

animals are observed for 42 days. By the end of observation period not the least than 80% of animals must remain alive without diphtheria intoxication (red adrenals). In Russia WHO approach was modified: guinea pigs are injected subcutaneously with purified diphtheria toxoid at a dose of at least 1500 Lf. During 42 days long observation period weight loss and animals dies must not appear. In case of death purified DT is not applicable. TT specific safety control is also carried out on guinea pigs. In accordance with WHO recommendations, five animals are injected subcutaneously with 500 Lf of purified TT. The animals are observed for 21 days daily, noting clinical signs of tetanus. If during the entire observation period no tetanus symptoms are observed in a single guinea pig and after the entire observation period 80% of the animals survives, tetanus toxoid is considered suitable for use. In Russia, the test for the absence of tetanus toxin is carried out similarly, excepting tetanus toxoid dose, which is 1500 Lf. The suitability criteria for purified TT are the absence of clinical signs of tetanus intoxication, weight loss and death of animals throughout entire observation period. Toxicity reversion tests are also provided. WHO considers guinea pig intradermal test to be suitable method for detecting diphtheria toxin, while guinea-pig methods are preferred for tetanus toxin, due to mice less sensitivity to tetanus toxin. In Russia, the most sensitive methods are used to detect the presence of toxins: intradermal administration to two guinea pigs in a volume of 0.1 ml or to one rabbit in a volume of 0.2 ml when testing diphtheria toxoid. Within four days, local reactions must not appear at the injection site. In the event of reactions, hence reversal of toxicity, the substance is rejected. When testing tetanus toxoid, five guinea pigs are injected subcutaneously into both sides of ten single human doses. Animals should be free of clinical signs of tetanus for 21 days after injection. Diphtheria and tetanus toxoids, after adsorption to a suitable adjuvant are monitored for specific safety. In accordance with WHO recommendations, at least 5 single human doses are administered subcutaneously to five guinea pigs. In case of testing adsorbed diphtheria toxoid, animals are observed for 42 days, tetanus toxoid – 21 days. The criteria for evaluating the suitability of adsorbed DT and TT are similar: during the entire observation period, animals should not show signs of diphtheria or tetanus intoxication; at the end of the observation period, at least 80% of the animals remain alive. In Russia, to test adsorbed DT and TT, five guinea pigs are injected subcutaneously with 10 single human doses. The duration of observation of animals in the DT test is 21 days, in the TT test – 30 days. The drug is considered to have passed the test if, during the entire observation period, the animals did not experience weight loss, signs of tetanus or, respectively, diphtheria intoxication, and all animals remained alive. In the event of the death of at least one animal in both cases from specific intoxication, the drug is considered not to have passed the test. Modern identifying potency (immunogenicity) of diphtheria toxoid and tetanus toxoid tests are based on determining immunized animals resistance for administration challenge toxin or evaluation of protective antibodies level in serum. In Russia to assess the potency of diphtheria toxoid (DT) and tetanus toxoid the challenge lethal method has been used for more than 60 years, challenge is based on determination of potency via its possibility to defend immunized animals from lethal doses of toxins. This method is used as «golden standard». The analysis of normative documents and guidelines of the World Health Organization, the European Union, the USA and Japan, concerning the issues of safety assessment and methods for determining the immunogenicity of diphtheria and tetanus toxoids at all stages of production, was carried out. It has been established that the approach adopted in the Russian Federation meets all international requirements. Moreover, with regard to methods for detecting reversion of toxicity, the most sensitive methods and more stringent criteria for the acceptance of experience are applied. The review presents data on methods for determining the immunogenicity of vaccines for the prevention of diphtheria and tetanus in the world. The advantages and disadvantages of some methods are reflected. The results of the analysis of these methods allow us to conclude that it is necessary to harmonize domestic and international methods for assessing the safety and immunogenicity of diphtheria and tetanus toxoids, which will make it possible not only to facilitate the registration of foreign vaccines in Russia, but also to speed up the registration of domestic vaccines in other countries.

Keywords: specific toxicity, reversion to toxicity, diphtheria toxoid, tetanus toxoid, potency assay, safety, efficacy

No conflict of interest to declare.

For citation: Komarovskaya EI, Perelegyna OV. Current state of methods for control the safety and potency of diphtheria toxoid and tetanus toxoid in combined vaccines. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(3):96–106(In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-3-96-106>

Дифтерия и столбняк известны с древнейших времен. Дифтерия часто была причиной широкомаштабных эпидемий и высокой детской смертности. Клиническая картина столбняка, заболевания с высокой летальностью, поражающего любую возрастную группу, была подробно описана Гиппократом.

В конце XIX века были доказаны этиология и эпидемиология этих заболеваний: выявлены и описаны возбудители, показано, что оба заболевания являются токсикоинфекциями. Были получены гипериммунные лошадиные сыворотки к обоим возбудителям, что послужило началом серотерапии,

позволившей значительно снизить количество летальных исходов. В начале 1920-х гг. независимыми группами ученых были получены дифтерийный и столбнячный анатоксины. В 1927 г. Г. Рамон (G. Ramon) и К. Золлер (K. Zoeller) объединили столбнячный и дифтерийный анатоксины и доказали отсутствие между ними антигенной конкуренции при совместном введении. Г. Рамон с коллегами первыми разработали адекватные методы для оценки свойств токсинов, условий детоксикации и контроля антигенных свойств анатоксинов [1–3].

К середине 1940-х гг. дифтерийный анатоксин объединили со столбнячным анатоксином

и цельноклеточной вакциной против коклюша. В дальнейшем компоненты вакцины были адсорбированы на гидроксиде или фосфате алюминия. При этом иммуногенность дифтерийного и столбнячного анатоксинов усилилась за счет коклюшной вакцины и адъюванта [2].

В 1940–1960 гг. Национальными органами здравоохранения в разных странах были разработаны требования к качеству вакцин и методы определения их эффективности, которые значительно различались между собой.

В 1955 г. был выпущен Первый Международный стандарт адсорбированного дифтерийного анатоксина [4] и некоторые производители начали применять методы контроля эффективности дифтерийного анатоксина с использованием Международного стандарта, при этом активность анатоксина в конечном продукте выражали в международных единицах (МЕ).

Требования ВОЗ к коклюшной вакцине были сформулированы в 1963 г. [5]. В 1964 г. ВОЗ были опубликованы руководящие принципы по производству вакцин против дифтерии и столбняка [6]. Были установлены требования к токсину и анатоксину, процедуры определения безвредности и эффективности анатоксинов на отдельных стадиях производства, а также требования к готовому продукту. В 1965 г. был выпущен Первый Международный стандарт адсорбированного столбнячного анатоксина [7].

К 1978 г. в ряде стран были приняты требования ВОЗ к испытанию активности дифтерийного анатоксина, основанные на иммунизации морских свинок эталонной и тестируемой вакциной с последующим введением провокационной дозы токсина. В 1978 г. пересмотренные Требования к трехвалентным вакцинам (КДС) были сведены ВОЗ в один документ [8], который пересматривался в 1990 г., 2005 г. и 2013 г. [9–11].

С 1970 г. и до середины 1990-х гг. производство АКДС-вакцины достигло значительных объемов. Так в 1992 г. в 42 странах было 63 производителя вакцины АКДС [2]. В 1992 г. на 45-ой Всемирной ассамблее здравоохранения была принята резолюция о том, что все вакцины, используемые в национальных программах иммунизации, должны соответствовать требованиям ВОЗ. Одной из причин для принятия резолюции послужили случаи неэффективности применения столбнячного анатоксина с пониженной активностью у беременных женщин с целью профилактики неонатального столбняка [12]. В настоящее время производители, а также национальные органы-регуляторы применяют разные подходы для определения качества вакцин для профилактики дифтерии и столбняка. Некоторые следуют рекомендациям ВОЗ и процедурам Европейской фармакопеи, тогда как другие следуют процедурам Национального института здоровья (NIH), используемым в США, с изменениями или без них.

В последние годы проводится работа по созданию единых подходов для оценки качества в странах членов Евразийского экономического союза (ЕАЭС). Одним из основных условий данной работы является гармонизация нормативных требований ЕАЭС с рекомендациями ведущих стран и международных организаций [13,14].

Основная **цель работы** – предоставить обзор современных методов контроля безопасности и эффективности (специфической активности) дифтерийного и столбнячного анатоксинов, провести сравнительный анализ методов.

Оценка безопасности дифтерийного и столбнячного анатоксинов

Производство дифтерийного анатоксина (ДА) и столбнячного анатоксина (СА) является многоступенчатым процессом, включающим культивирование токсин-продуцирующих штаммов *C. diphtheriae* и *C. tetani* в жидких питательных средах, отделение супернатантов, содержащих экзотоксины, детоксикацию формальдегидом, которая может выполняться до или после очистки токсина. В дальнейшем очищенные дифтерийный и столбнячный анатоксины адсорбируют на соответствующем адъюванте и вносят консервант (в случае многодозовой формы выпуска).

В соответствии с Техническим докладом ВОЗ № 800 на каждом этапе производства вакцины осуществляется контроль критических точек с помощью утвержденных методов [15]. Культуры *C. diphtheriae* и *C. tetani*, используемые для производства вакцин, контролируют на чистоту путем микроскопии или посева на соответствующие среды. В качестве вакцинных штаммов следует подобрать штамм, обладающий высоким токсинообразованием, а также способностью образовывать стабильный анатоксин. Для производства ДА многие производители используют штамм *C. diphtheriae* Park Williams 8, что соответствует рекомендациям ВОЗ. Для получения СА у ВОЗ отсутствуют рекомендации относительно штамма. Многие производители используют штамм Harvard [14]. В нашей стране для получения ДА применяют штамм *C. diphtheriae* Park Williams 8, для СА – штамм Harvard, которому в 1956 г., согласно существовавшей номенклатуре, был присвоен номер 228 [16].

Полученный супернатант каждой культуры оценивают в отношении активности содержащегося в нем токсина, используя методы *in vivo* и/или *in vitro*. Для производства ДА активность токсина должна составлять не менее 50 Лф/мл, для СА – не менее 40 Лф/мл (Лф – единица флокуляции). После конверсии токсина в анатоксин оценивают активность анатоксина.

Анатоксины должны удовлетворять главным условиям безопасности – отсутствию остаточной токсичности (специфическая безопасность) и невозможности реверсии токсических свойств.

Контроль специфической безопасности ДА проводят на морских свинках или кроликах.

В соответствии с рекомендациями ВОЗ пяти морским свинкам вводят подкожно 1 мл очищенного дифтерийного анатоксина, содержащего не менее 500 Lf, наблюдают за животными в течение 42 дней [15]. Животных, погибших в этот период, подвергают аутопсии для выявления характерного признака дифтерийной интоксикации (красные надпочечники). К концу периода наблюдения должно остаться в живых не менее 80% животных без признаков дифтерийной интоксикации (потеря в массе тела).

В России подход, принятый ВОЗ, был модифицирован: увеличена доза анатоксина и выработаны более жесткие критерии приемлемости. Морским свинкам подкожно вводят очищенный дифтерийный анатоксин в дозе не менее 1500 Lf. За время наблюдения в течение 42 суток не должно наблюдаться потери массы тела и гибели животных. В случае гибели одного и более животных от дифтерийной интоксикации очищенный ДА применению не подлежит [17].

При испытаниях на кроликах животным внутривенно вводят не менее 20 Lf очищенного ДА. Эритема диаметром более 5 мм и некроз на месте инъекции свидетельствуют о присутствии необезвреженного дифтерийного токсина.

Производители в некоторых странах для подтверждения отсутствия дифтерийного токсина в препарате используют альтернативный метод на культуре клеток Vero, подтвердив, что чувствительность данного метода не уступает чувствительности испытания на морских свинках.

Контроль специфической безопасности СА проводят также на морских свинках.

В соответствии с рекомендациями ВОЗ пяти животным вводят подкожно 500 Lf очищенного столбнячного анатоксина [15]. За животными ежедневно в течение 21 дня проводят наблюдения, отмечая наличие или отсутствие клинических признаков столбнячной интоксикации (специфические параличи). Если за весь период наблюдения ни у одной морской свинки не наблюдаются симптомы столбняка и по истечении всего срока наблюдения остается в живых 80% животных, столбнячный анатоксин считается пригодным к использованию.

В России тест на отсутствие столбнячного токсина проводят аналогично, исключением является величина дозы испытуемого столбнячного анатоксина, которая составляет 1500 Lf. Критериями пригодности очищенного СА служат отсутствие клинических признаков столбнячной интоксикации, потери массы тела и гибели животных за весь период наблюдения [17].

Тест на реверсию токсичности выполняют с целью продемонстрировать, что при хранении анатоксина возврат токсических свойств невозможен.

Дифтерийный или столбнячный анатоксин разводят до концентрации как в готовом препарате и делят на две части. Одну часть инкубируют при температуре 37 ± 1 °C, вторую

часть – при температуре 5 ± 3 °C. Время инкубации составляет 42 суток для обоих анатоксинов. В некоторых странах дополнительно инкубируют при температуре 34 °C. Методам, применяемым для определения очень малых доз токсинов в субстанциях, необходимо обладать высокой чувствительностью и быть утвержденными национальным органом-регулятором. В анатоксинах должны полностью отсутствовать соответствующие токсины. ВОЗ подходящими методами для обнаружения дифтерийного токсина считает внутривенные пробы на морских свинках, для столбнячного токсина предпочтительней методы на морских свинках, поскольку мыши менее чувствительны к столбнячному токсину [15].

В России для выявления присутствия токсинов используют наиболее чувствительные методы: внутривенное введение двум морским свинкам в объеме 0,1 мл или одному кролику в объеме 0,2 мл при испытании дифтерийного анатоксина [18]. Ежедневно в течение четырех суток фиксируют состояние животных. В месте введения субстанции должны отсутствовать местные реакции, свидетельствующие о реверсии токсичности. В случае наличия реверсии токсичности субстанцию бракуют.

При испытании на реверсию токсичности столбнячного анатоксина пяти морским свинкам вводят подкожно 5 мл (по 2,5 мл в оба бока) субстанции, что соответствует десяти разовым дозам/прививочным дозам для человека. В течение 21 суток после инъекции у животных не должно наблюдаться клинических признаков столбняка.

В некоторых странах для выявления токсинов используют метод *in vitro* на культуре клеток Vero.

Анатоксины должны соответствовать требованиям к стерильности, быть максимально свободными от детоксицирующего агента, а также оцениваться по показателю чистоты антигена. Чистота антигена выражается в количестве флокулирующих единиц (Lf), содержащихся в одном миллиграмме белкового (недиализуемого) азота. Испытание проводят путем сравнения с Международным стандартом или с национальным образцом, откалиброванным относительно Международного стандарта: для дифтерийного анатоксина эта величина составляет 1500 Lf, а для столбнячного анатоксина – 1000 Lf на 1 мг белкового азота. В готовом препарате, в случае применения для первичной иммунизации, количество ДА не должно превышать 30 Lf в прививочной дозе (0,5 мл), СА – 25 Lf.

Если анатоксин отвечает требованиям, то добавляют адъювант, консервант (при необходимости). На данном этапе продукт контролируют на стерильность, специфическую токсичность и иммуногенную (специфическую) активность. Определяют pH и количество остаточного свободного инактивирующего агента.

Адсорбированные дифтерийный и столбнячный анатоксины также контролируют на специфическую

безопасность. В соответствии с рекомендациями ВОЗ [15] тест проводят на 5 морских свинках. Животным подкожно вводят количество анатоксина, эквивалентное по меньшей мере 5 разовым дозам для человека. При испытании адсорбированного дифтерийного анатоксина за животными наблюдают в течение 42 суток, а при испытании адсорбированного столбнячного анатоксина – 21 сутки. Критерии оценки пригодности адсорбированных ДА и СА аналогичны: в течение всего периода наблюдения животные не должны проявлять признаков дифтерийной или, соответственно, столбнячной интоксикации; по истечении срока наблюдения остается в живых не менее 80% животных.

В России для испытания адсорбированных ДА и СА пяти морским свинкам подкожно вводят по 10 разовых доз для человека. Продолжительность наблюдения за животными при испытании СА составляет 21 день, при испытании ДА – 30 дней. Препарат считается прошедшим испытание, если за весь срок наблюдения у животных не наблюдалось потери массы тела, признаков столбнячной или, соответственно, дифтерийной интоксикации и все животные остались живы. В случае гибели хотя бы одного животного в обоих случаях от специфической интоксикации препарат считают не прошедшим испытание. При гибели одного животного от неспецифической причины тест повторяют. В случае повторной гибели от неспецифической причины анатоксин не используют [18].

В действующем издании Европейской фармакопеи перечень требований к готовым формам комбинированных вакцин не содержит теста на специфическую безопасность, что дает основание зарубежным производителям исключать его из требований к качеству при выпуске препарата [19]. Однако подчеркивается, что данный тест является главным свидетельством того, что производство вакцин валидировано.

Оценка специфической активности (иммуногенности)

Методы определения специфической активности дифтерийного анатоксина, одобренные ВОЗ

Специфическую активность дифтерийного анатоксина определяют введением провокационных доз токсина иммунизированным животным или определением титра специфических антител в сыворотке крови иммунизированных животных (серологические методы) [11]. В обоих случаях расчет показателя специфической активности проводят по отношению к стандартному образцу, калиброванному в Международных единицах (МЕ), в тесте летального заражения. Результат выражают в количестве МЕ активности, содержащихся в прививочной дозе (0,5 мл). Для вакцин, используемых при первичной иммунизации, прививочная доза должна иметь активность не менее 30 МЕ (нижний предел доверительного интервала), для вакцин со

сниженным содержанием антигенов – не менее 2 МЕ.

1. Методы с введением разрешающих доз токсина

Методы основаны на сравнении уровня защиты, вызываемой у иммунизированных морских свинок, испытуемой вакциной, с уровнем защиты, которую вызывает введение референс-препарата, откалиброванного в международных единицах. Результат выражают в количестве Международных единиц (МЕ) активности, содержащихся в прививочной дозе (0,5 мл).

Существуют два метода: а) метод внутрикожных/кожно-некротических проб и б) метод летального заражения.

а) Метод кожно-некротических проб

Метод основан на способности дифтерийного анатоксина защищать иммунизированных морских свинок от дермoneкротического действия дифтерийного токсина. Животных иммунизируют эквивалентными дозами референс-препарата, и испытуемой вакциной (не менее трех доз для каждого препарата). Через 28 дней проводят внутрикожные инъекции провокационных доз токсина в соответствующих концентрациях. Через 48 часов после инъекции токсина все места провокации контролируют на предмет наличия признаков специфической кожной реакции и степени их развития (гиперемия, некроз). Опыт сопровождают введением контрольных доз токсина неиммунизированным свинкам. Индивидуальные ответы каждого животного регистрируют и преобразовывают с помощью формулы углового преобразования (критерий Фишера ϕ). Расчет иммуногенной активности вакцины производят методом параллельных линий.

б) Метод летального заражения

Методом летального заражения определяют специфическую активность по способности ДА защищать иммунизированных морских свинок от заражения летальной разрешающей дозой дифтерийного токсина. Метод принят в качестве «золотого стандарта».

Животных иммунизируют аналогичными дозами референс-препарата и испытуемой вакцины (не менее трех доз для каждого препарата). Через 28 суток после иммунизации всем животным вводят разрешающую дозу токсина (100 Ld_{50} /мл). Опыт сопровождают контролем величины LD_{50} токсина на неиммунизированных животных. Наблюдают в течение 4–5 суток, регистрируя количество павших и здоровых животных. На основании полученных результатов проводят расчет иммуногенной активности дифтерийного анатоксина с помощью соответствующих статистических методов, определяя величины ED_{50} для референс-препарата (в МЕ) и испытуемой вакцины, и величину LD_{50} введенного токсина.

Применяется также упрощенный метод определения специфической активности – с одним

разведением. Он не позволяет рассчитать количественное содержание дифтерийного анатоксина в вакцине, но позволяет сделать заключение о том, что активность испытуемой вакцины значительно выше минимально требуемой. Активность подтверждают при соблюдении условий достоверности $p \geq 0,5$ (односторонний критерий Фишера).

Испытание с множественными разведениями применяют для проверки стабильности процесса производства вакцины, а также для калибровки эталонных образцов. Метод с одним разведением наиболее удобен в тех случаях, когда активность вакцины стабильна, а также неизменно и существенно превышает минимум, установленный требованиями ВОЗ.

2. Серологические методы определения специфической активности дифтерийного анатоксина

Определение активности дифтерийного анатоксина по интенсивности антителообразования у иммунизированных животных возможно двумя методами: а) методом иммуноферментного анализа (ИФА) и б) титрованием сыворотки крови на клетках Vero. В обоих случаях оценку специфической активности испытуемого лекарственного препарата проводят в параллельных испытаниях с референс-препаратом, калиброванным в МЕ.

Морских свинок иммунизируют эквивалентными дозами референс-препарата и испытуемой вакцины. В качестве отрицательного контроля формируют группу из неиммунизированных животных. Через 5–6 недель проводят забор крови и отделяют сыворотку. Затем в сыворотке иммунизированных животных определяют уровень защитных антител одним из указанных методов.

Тест может быть выполнен как с одним, так и с тремя разведениями.

а) Титрование сыворотки крови морских свинок методом ИФА

Иммуноферментный анализ основан на том, что специфичные противодифтерийные IgG сыворотки будут связываться с дифтерийным антигеном, сорбированным в лунках микропланшета. Связавшиеся с антигеном специфические антитела сыворотки морских свинок выявляют с помощью вторичных антител (специфичных по отношению к сыворотке морской свинки), конъюгированных с ферментами, дающими при наличии определенных субстратов цветную реакцию, которую регистрируют по показателю оптической плотности. Параллельно на микропланшете титруют стандартный образец противодифтерийной сыворотки, например «Guinea pig serum (Diphtheria and Tetanus Antitoxin, NIBSC code 98/572)» [11,20]. Кривая зависимости оптической плотности от логарифма разведения, полученная для стандартного образца противодифтерийной сыворотки, используется для дальнейших расчетов титров

антител испытуемого и референс-препарата. С ее помощью рассчитывают количество антител (титр) в сыворотке испытуемых животных в МЕ/мл. В качестве референс-препарата используют препарат с активностью (иммуногенностью), установленной методом летального заражения. Для перевода результатов испытания, полученных в виде титров специфических антител, в единицы относительной активности (иммуногенности) используют специально разработанные методы расчета с помощью компьютерных программ статистического анализа (SPSS, SAS, CombiStats). Для подтверждения подлинности полученных результатов необходимо соответствие критериям, относящимся к характеристикам калибровочной кривой (коэффициент наклона, коэффициент корреляции) и кривых зависимости доза-эффект, полученных для сыворотки каждого животного, коэффициентам вариации, линейности и параллелизму кривых доза-эффект для испытуемого и референс-препаратов и т.д.

Полученные сыворотки крови используют также для определения активности столбнячного анатоксина при иммунизации животных комбинированными вакцинами.

б) Титрование сыворотки крови морских свинок на клетках Vero

Сыворотку животных, иммунизированных испытуемой или референс-вакциной, инкубируют с дифтерийным токсином и делают серию двукратных разведений смеси в лунках микропланшета, в которые затем вносят клетки Vero. Не нейтрализованный токсин вызывает гибель клеток Vero. При полной нейтрализации токсина клетки остаются живыми, и их жизнедеятельность выявляется по закислению культуральной среды, что визуализируется степенью окраски среды. Чем больше в сыворотке защитных антител, тем большее количество разведений сыворотки проявляют положительный эффект. Полученные значения титров для каждого образца экстраполируются на кривую доза-ответ для референс-вакцины.

в) Титрование сыворотки крови мышей на клетках Vero

Мыши не чувствительны к заражению дифтерийным токсином, поэтому применение методов с введением токсина невозможно. Но определение активности ДА возможно путем обнаружения антител в сыворотке крови иммунизированных мышей методом титрования на культуре клеток Vero. Принцип и протокол проведения теста соответствует аналогичному тесту на морских свинках.

г) Токсин-нейтрализующий тест *in vivo* (ТНТ)

В основе теста – дермoneкротическое свойство дифтерийного токсина при внутрикожном введении, которое также может использоваться для определения нейтрализующей способности антител. Для постановки теста иммунизируют

группу морских свинок или кроликов, собирают кровь, отделяют сыворотку. Сыворотки, полученные от каждого животного, объединяют в общий пул. Готовят различные разведения сыворотки, которые смешивают с фиксированным количеством дифтерийного токсина. Смесь вводят внутрикожно. Эффективность ДА определяется путем сравнения дозы, необходимой для защиты животных от возникновения эритемы фиксированной дозой дифтерийного токсина, с дозой стандартного антитоксина (противодифтерийная сыворотка), калиброванной в МЕ, необходимой для обеспечения такой же защиты. Затем определяется эффективность исследуемого препарата по отношению к стандартной сыворотке и выражается в МЕ/мл.

В данном методе референс-препарат вакцины не используется, что не позволяет оценить статистическую достоверность результатов.

Методы определения специфической активности столбнячного анатоксина, одобренные ВОЗ

В Руководстве ВОЗ по контролю качества вакцины против дифтерии, столбняка и коклюша описаны методы определения специфической активности столбнячного анатоксина (СА), которые можно разделить на две группы: с применением разрешающих доз токсина и серологические – иммунохимический метод на морских свинках, серологический метод на мышах (ToBI) и токсин-нейтрализующий тест (TNT) [11].

1. Метод с применением разрешающих доз токсина на морских свинках и на мышах

Специфическую активность адсорбированного столбнячного анатоксина данным методом определяют по способности защищать иммунизированных животных от заражения летальной дозой столбнячного токсина и выражают в количестве Международных единиц (МЕ) активности, содержащихся в прививочной дозе (0,5 мл). Испытание возможно проводить на морских свинках и мышах, методом с одним или множественными разведениями. Протоколы проведения теста на обоих видах животных полностью аналогичны.

Животных иммунизируют аналогичными дозами референс-препарата и испытуемой вакцины. Опыт сопровождают контролем величины LD_{50}/PD_{50} токсина. Через 28 суток (некоторые лаборатории выдерживают животных от 4 до 6 недель) всем иммунизированным животным вводят разрешающую дозу столбнячного токсина. Наблюдают в течение 4 суток, регистрируя количество павших, здоровых и клинические проявления столбняка у больных животных. На основании полученных результатов проводят расчет иммуногенной активности столбнячного анатоксина с помощью соответствующих статистических методов, определяя величины ED_{50} для референс-препарата (в МЕ) и испытуемой вакцины, и величину LD_{50}/PD_{50} введенного токсина.

2. Серологические методы определения специфической активности столбнячного анатоксина

Определение уровня образования противостолбнячных антител в сыворотке иммунизированных морских свинок возможно с использованием методов: ИФА и ингибирование связывания токсина (Toxin Binding Assay – ToBI).

Морских свинок иммунизируют эквивалентными дозами референс-препарата и испытуемой вакцины в трех разведениях. В качестве отрицательного контроля формируют группу из неиммунизированных животных. Через 5–6 недель проводят забор крови. Отделяют сыворотку.

а) Титрование сыворотки крови морских свинок методом ИФА

Определение титра специфических к столбняку антител в сыворотке крови морских свинок методом ИФА и расчет иммуногенности полностью соответствует процедуре описанной для дифтерийного анатоксина.

б) Метод ингибирования связывания токсина (ToBI)

Тест ToBI основан на титровании сыворотки крови морских свинок путем инкубации с известным количеством столбнячного токсина или анатоксина. Несвязанный токсин/анатоксин определяют методом ИФА, используя противостолбнячную сыворотку для связывания со свободным токсином. Количество связанного токсина или анатоксина обнаруживают путем последовательной инкубации со специфическими IgG морской свинки, конъюгированными с пероксидазой хрена, с последующей хромогенной реакцией с субстратом тетраметилбензидина/ H_2O_2 . Специфическую активность анализируемой вакцины рассчитывают путем интерполирования результатов на кривую для стандартного образца и выражают в МЕ/мл.

в) Метод ингибирования связывания токсина (ToBI) на мышах

В соответствии с последним пересмотром рекомендаций ВОЗ (2012) [11], титрование иммунных сывороток может быть выполнено *in vitro* с помощью теста ToBI на мышах при условии, что доказана корреляция между тестом ToBI и методом летального заражения на мышах для конкретного продукта. Тест проводят методом множественных разведений. Протокол проведения теста на мышах соответствует тесту ToBI титрования сыворотки крови морских свинок.

г) Токсин-нейтрализующий тест (TNT) на мышах

Целью теста нейтрализации столбнячного токсина (TNT) является определение специфической активности столбнячного антитоксина у иммунизированных мышей путем сравнения дозы исследуемого препарата, необходимой для защиты мышей от паралитического действия столбнячного

токсина, с дозой стандартного антитоксина, калиброванного в МЕ, необходимой для обеспечения такой же защиты.

Методы определения специфической активности столбнячного и дифтерийного анатоксинов, принятые в Российской Федерации

В России для определения специфической активности столбнячного и дифтерийного анатоксинов используют два метода: один – с применением разрешающих доз токсина («метод летального заражения») [21,22] и другой – определение специфической активности по выживаемости [23,24]. Метод летального заражения используют для комбинированных вакцин и моновакцин, а также для анатоксинов, которые применяются для первичной вакцинации. Для препаратов со сниженным содержанием антигенов используют метод оценки специфической активности по выживаемости.

Исследования дифтерийного анатоксина проводят на аутбредных морских свинках, столбнячного – на аутбредных мышах.

Протоколы проведения испытаний методом летального заражения полностью соответствуют приведенным в Руководстве ВОЗ [11].

Отсутствуют требования к значению показателей активности дифтерийного и/или столбнячного компонентов со сниженным содержанием антигенов, входящих в состав вакцины. Для таких вакцин используется метод определения специфической (иммуногенной) активности по выживаемости, который заключается в том, что при введении летальных доз соответствующего токсина иммунизированным животным 100% должны остаться живыми при заражении дифтерийным токсином и не менее 70% – при заражении столбнячным токсином.

Методы определения специфической активности, принятые в других странах

Страны Евросоюза поддерживают подход, принятый ВОЗ, основанный на использовании эталонного препарата, калиброванного по международному стандарту, и выражение активности вакцины в международных единицах.

В Европейской фармакопее (ЕФ) описаны три метода определения специфической активности дифтерийного анатоксина [25]: кожно-некротических проб (метод А); летального заражения (метод В); иммунохимический (метод С), который допускает два способа определения уровня антител в сыворотке крови морских свинок: ИФА или на клетках Vero.

Для столбнячного анатоксина используют методы: летального заражения на морских свинках (метод А), летального заражения на мышах (метод В) или иммунохимический (метод С), при котором определение титра специфических к столбняку антител в сыворотке крови морских свинок возможно

двумя тестами: ИФА и ингибирования связывания токсина (ToBI) [26].

В рекомендациях японского Национального института инфекционных заболеваний эффективность дифтерийного анатоксина определяют методом летального заражения на морских свинках (с применением референс-образца) или методами титрования иммунных сывороток, таких как токсин-нейтрализующий тест *in vivo* на кроликах, титрование сыворотки крови морских свинок или мышей на культуре клеток или методом пассивной гемагглютинации. Эффективность столбнячного анатоксина определяют методом летального заражения на морских свинках или мышах или путем титрования сыворотки крови животных методом нейтрализации токсина [27].

В США для определения иммуногенности СА и ДА определяют титр соответствующих антител в сыворотке крови методом нейтрализации токсина антитоксином [11].

В таблицах 1 и 2 представлено сравнение методов оценки иммуногенности дифтерийного и столбнячного анатоксинов, используемых в мире.

Для вакцин со сниженным содержанием антигенов приняты методы и значение активности, описанные в руководствах ВОЗ и действующим изданием ЕФ.

Заключение

Сравнение методов оценки безопасности анатоксинов в России и зарубежных странах продемонстрировало, что при едином подходе к регламентирующим требованиям и используемым методам имеются различия в деталях, касающихся выбора более высоких дозировок испытуемых препаратов для обеспечения чувствительности метода и интерпретации полученных результатов в России.

Несмотря на достаточное количество методов оценки специфической активности анатоксинов только один принят как «золотой стандарт», для ДА – метод летального заражения на морских свинках, для СА – метод летального заражения на морских свинках и на мышах. Для того чтобы применять альтернативный метод, необходимо доказать корреляцию между этим методом и «золотым стандартом» для конкретного продукта.

Разработка альтернативных методов, в частности серологических, была продиктована появлением новых аналитических методов и принятой в Европе концепцией 3Rs («TreeRs»): Replacement, Reduction, Refinement – замена, сокращение, усовершенствование. Главной целью этих методов являлась разработка способа оценки иммуногенности без применения специфических токсинов, сокращение числа используемых животных, оценка возможности использовать одних и тех же животных для определения иммуногенности нескольких антигенов в рутинном контроле.

Метод иммуноферментного анализа позволяет использовать одних и тех же морских свинок

Таблица 1. Методы оценки иммуногенности дифтерийного анатоксина в составе вакцин и анатоксинов
Table 1. Methods for assessing the immunogenicity of diphtheria toxoid in the combined vaccines

Наименование метода Method		Руководство ВОЗ Manual WHO	Государственная фармакопея Российской Федерации Russian pharmacopoeia	Европейская фармакопея European pharmacopoeia	Фармакопея США USP	Фармакопея Японии Japan pharmacopoeia
Метод летального заражения Lethal Challenge Method		+	+	+	–	+
Метод кожных проб Intradermal Challenge Method		+	–	+	–	–
Метод по выживаемости Survival method		–	+	–	–	–
Токсин-нейтрализующий тест Toxin neutralisation test	Морские свинки Guinea pig	+	–	–	+	–
	Кролики Rabbit	+	–	–	+	+
Определение титра антител в сыворотке крови животных Determination of Antibodies	ИФА (морские свинки) ELISA (guinea pig sera)	+	–	+	–	–
	На культуре клеток Vero (кровь морской свинки) Vero cell toxin neutralisation test (guinea pig sera)	+	–	+	–	+
	На культуре клеток Vero (кровь мыши) Vero cell toxin neutralisation test (mice sera)	+	–	–	–	+
	Пассивной гемагглютинации Passive hemagglutination method	–	–	–	–	+

Примечание: + метод описан в национальной фармакопее; – метод отсутствует в национальной фармакопее.
 Note: + the method is described in the national pharmacopoeia; – the method is not in the national pharmacopoeia.

для определения иммуногенности и дифтерийного, и столбнячного анатоксинов. Кроме того, метод включает применение токсинов в анализе. В коллоидных испытаниях под эгидой ВОЗ было продемонстрировано, что уровень антител против столбняка и дифтерии в сыворотке иммунизированных животных прямо пропорционален протективной активности вакцины и индукция иммунного ответа у морских свинок сопоставима с ответом у людей [28,29].

В качестве альтернативного метода определения эффективности адсорбированного дифтерийного анатоксина ВОЗ рекомендует применять серологический метод с использованием клеток Vero. Недостатком этого метода является необходимость определять минимальную цитопатическую дозу для каждого исследования, что объясняется высокой чувствительностью клеток Vero к дозе токсина. Чувствительность культуры может существенно варьировать для каждой серии.

Следует отметить, что иммуноферментные методы оценки специфической активности вакцин имеют ряд особенностей. ИФА – это многоступенчатый процесс, в который вовлечены компоненты (как правило, антитела) различного происхождения, которые не являются коммерческими и, следовательно, не стандартизованы. Чувствительность метода также не стандартизована и различна у разных производителей. Оценка и анализ результатов ИФА проводят с использованием специально разработанных статистических программ. Для подтверждения достоверности полученных результатов необходимо выполнение всех предложенных критериев их оценки. В случае несоответствия критериям требуется повторное проведение анализа.

Рассматривая описанные методы, можно сделать заключение, что тесты с использованием токсинов для оценки степени защиты иммунизированных животных дают более четко выраженный и прямой ответ о протективной активности

Таблица 2. Методы оценки иммуногенности столбнячного анатоксина в составе вакцин и анатоксинов
Table 2. Methods for assessing the immunogenicity of tetanus toxoid in the combined vaccines

Наименование метода Method			Руководст- во ВОЗ Manual WHO	Государ- ственная фармако- поя Рос- сийской Федерации Russian pharma- copoeia	Европейс- кая фармакопоя European pharma- copoeia	Фармако- поя США USP	Фармако- поя Японии Japan pharma- copoeia
Метод летального заражения Lethal Challenge Method	На морских свинках Guinea pig		+	+	+	–	+
	На мышах Mice		+	–	+	–	+
Метод по выживаемости Survival method			–	+	–	–	–
Токсин-нейтрализующий тест Toxin neutralisation test			+	–	–	+	+
Определение титра антител в сыворотке крови животных Determination of Antibodies	ИФА (морские свинки) ELISA (guinea pig sera)		+	–	+	–	–
	ToBI Мыши Mice sera	Морские свинки Guinea pig sera	+	–	+	–	–
			+	–	–	–	–

Примечание: + метод описан в национальной фармакопее; – метод отсутствует в национальной фармакопее.
 Note: + the method is described in the national pharmacopoeia; – the method is not in the national pharmacopoeia.

препарата и обладают высокой стабильностью. В то же время результаты, полученные методами ИФА или с помощью клеток Vero, требуют статистических преобразований с применением компьютерных программ. Данные методы также являются более финансово затратными, т.к. требуют большого количества коммерческих реактивов и стандартов, являются более длительными и трудозатратными.

Метод оценки специфической активности по выживаемости, принятый в России для вакцин со сниженным содержанием антигенов, также как и метод оценки специфической активности по величине титра специфических антител (ТНТ), принятый в США, отличаются от общепринятого подхода к оценке специфической активности подобных вакцин. Недостатком российского метода является отсутствие требований к величине специфической активности, выраженной

в международных единицах. Методом США определяют только титр токсиннейтрализующих антител, что также не позволяет оценить иммуногенность вакцин в международных единицах активности.

Изучение современных материалов по оценке безопасности и определению эффективности дифтерийного и столбнячного анатоксинов позволяет заключить, что отсутствие единых общепринятых методов определения иммуногенности вакцин против дифтерии и столбняка приводит к проблемам с международным обменом вакцинами из-за трудностей во взаимном признании результатов тестирования. Очевидна необходимость гармонизации отечественных и международных методов оценки иммуногенности дифтерийного и столбнячного анатоксинов, что позволит не только облегчить регистрацию зарубежных вакцин в России, но и ускорить регистрацию отечественных вакцин в других странах.

Литература

- Plotkin SL, Plotkin SA. A Short History of Vaccination. In: Plotkin SA, Walter AO, Paul AO, et al. Plotkin's Vaccines, 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, [2018] ©2018 eBook. P. 1–15.
- Tejpratap SP, Wharton T, Wharton M. Diphtheria Toxoid. In: Plotkin SA, Walter AO, Paul AO, et al. Plotkin's Vaccines, 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, [2018] ©2018 eBook. P. 261–275.
- Roper MH, Wassilak SGF, Scobie HM, et al. Tetanus Toxoid. In: Plotkin SA, Walter AO, Paul AO et al. Plotkin's Vaccines, 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, [2018] ©2018 eBook. P. 1052–1079.
- World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 9th report: WHO TRS N°108: 1955.
- World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 16th report: WHO TRS N°274: 1963.
- World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 17th report: WHO TRS N°293: 1964.
- World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 16th report: WHO TRS N°329: 1965.
- World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 30th report: WHO TRS N°638: 1979.
- World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 17th report: WHO TRS N°800: 1990. Annex 2. Requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines.
- World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 17th report: WHO TRS N°927: 2005. Annex 5. Recommendations for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines (Amendments 2003).
- Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines, World Health Organization 2013. Ordering code: WHO/IVB/11.11.
- Сорок пятая сессия Всемирной ассамблеи здравоохранения: Женева, 4–14 Мая 1992 г.: резолюции и решения: приложения. Всемирная организация здравоохранения. Номер документа: WHA45/1992/REC/1. Доступно на: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/203139>. Ссылка активна на 12 декабря 2021.
- Алексеева И. А., Перельгина О. В., Колышкина Е. Д. Оценка стабильности производства коклюшного, дифтерийного и столбнячного компонентов АКДС-вакцины с помощью контрольных карт Шухарта. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2021;21(4):256–265. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-256-265>

14. Гаврилова Н. А., Олефир Ю. В., Меркулов В. А. и др. Взаимозаменяемость вакцин: проблемы и перспективы. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2021;21(3):142-157. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-142-157>
15. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 40th report: WHO TRS N°800: 1989.
16. Каталог штаммов, выпуск пятый, Clostridia. Кравченко А. Т., Черткова Ф. А., ред. Государственный контрольный институт медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича. Москва; 1963.
17. Фармакопейная статья 3.3.1.0010.15 Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная, Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т.4; 2018.
18. Фармакопейная статья 3.3.1.0002.15 Анатоксин дифтерийно-столбнячный адсорбированный (АДС-анатоксин), Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т.3; 2015.
19. Diphtheria and Tetanus vaccine (adsorbed), version 01/2021:0444. Ph. Eur. 10th Edition. Strasbourg, France: Council of Europe; European Pharmacopoeia online, www.pheur.edqm.eu/home
20. The National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) [Электронный ресурс] URL: <https://www.nibsc.org/documents/ifu/98-572.pdf>
21. Общая фармакопейная статья 1.7.2.0003.15 Иммуногенность адсорбированного дифтерийного анатоксина, Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т.2; 2018.
22. Общая фармакопейная статья 1.7.2.0004.15 Иммуногенность адсорбированного столбнячного анатоксина, Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т.2; 2018.
23. Фармакопейная статья 3.3.1.0003.15 Анатоксин дифтерийно-столбнячный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигенов (АДС-М-анатоксин), Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т.4; 2018.
24. Фармакопейная статья 3.3.1.0004.15 Анатоксин дифтерийный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигена (АД-М-анатоксин), Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т.4; 2018.
25. Assay of diphtheria vaccine (adsorbed), general chapter 2.7.6 version 01/2008:20706. Ph. Eur. 10th Edition. Strasbourg, France: Council of Europe; European Pharmacopoeia online, www.pheur.edqm.eu/home
26. Assay of tetanus vaccine (adsorbed), general chapter 2.7.8 version 01/2008:20708. Ph. Eur. 10th Edition. Strasbourg, France: Council of Europe; European Pharmacopoeia online, www.pheur.edqm.eu/home
27. Minimum requirements for biological products National Institute of Infectious Diseases Japan, 2006. <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/methods/biologics/vaccine/japan-minreqs.pdf>
28. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO/BS/09.2123. Collaborative Study: Calibration of Replacement WHO International Standard for Diphtheria Toxoid Adsorbed.
29. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO/BS/10.2150. International Collaborative Study: Calibration of Replacement WHO International Standard for Tetanus Toxoid Adsorbed.

References

1. Plotkin SL, Plotkin SA. A Short History of Vaccination. In: Plotkin SA, Walter AO, Paul AO, et al. Plotkin's Vaccines, 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, [2018] ©2018 eBook. P. 1–15.
2. Tejpratap SP, Wharton T, Wharton M. Diphtheria Toxoid. In: Plotkin SA, Walter AO, Paul AO, et al. Plotkin's Vaccines, 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, [2018] ©2018 eBook. P. 261–275.
3. Roper MH, Wassilak SGF, Scobie HM et al. Tetanus Toxoid In: Plotkin SA, Walter AO, Paul AO, et al. Plotkin's Vaccines, 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, [2018] ©2018 eBook. P. 1052–1079.
4. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 9th report: WHO TRS N°108: 1955.
5. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 16th report: WHO TRS N°274: 1963.
6. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 17th report: WHO TRS N°293: 1964.
7. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 16th report: WHO TRS N°329: 1965.
8. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 30th report: WHO TRS N°638: 1979.
9. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 17th report: WHO TRS N°800: 1990. Annex 2. Requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines.
10. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 17th report: WHO TRS N°927: 2005. Annex 5. Recommendations for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines (Amendments 2003).
11. Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines, World Health Organization 2013.
12. Forty-fifth World Health Assembly resolutions and decisions, annexes Geneva, 4-14 May 1992. Number of document WHA45/1992/REC/1. World Health Organization. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/203139> Accessed: 12 Dec 2021 (In Russ.).
13. Alekseeva IA, Perelygina OV, Kolyshkina ED. Estimation of production consistency of diphtheria, tetanus, and pertussis components of the DTP vaccine using Shewhart charts BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2021;21(4):256–265 (In Russ.). doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-256-265
14. Gavrilova N.A., Olefir Yu.V., et al. Vaccine interchangeability: problems and prospects. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2021;21(3):142–157 (In Russ.). doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-142-157
15. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical Report Series. 40th report: WHO TRS N°800: 1989.
16. Strains catalog, fifth issue, Clostridia. Ed.: Kravchenko A.T., Chertkova F.A. State Control Institute of Medical Biological Products named after L.A. Tarasovich. Moscow; 1963 (In Russ.).
17. Pharmacopoeia monograph 3.3.1.0010.15 Pertussis (whole cell)-diphtheria-tetanus vaccine, adsorbed. The State Pharmacopoeia of Russian Federation 14 ed. P. 4. Moscow; 2018 (in Russ.).
18. Pharmacopoeia monograph 3.3.1.0002.15 Diphtheria-tetanus vaccine, adsorbed. The State Pharmacopoeia of Russian Federation 13 ed. P. 3. Moscow; 2015 (in Russ.).
19. Diphtheria and Tetanus vaccine (adsorbed), version 01/2021:0444. Ph. Eur. 10th Edition. Strasbourg, France: Council of Europe; European Pharmacopoeia online. Available at: www.pheur.edqm.eu/home
20. The National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Available at: <https://www.nibsc.org/documents/ifu/98-572.pdf>
21. General pharmacopoeia monograph 1.7.2.0003.15. Potency assay of diphtheria vaccine (adsorbed). The State Pharmacopoeia of Russian Federation 14 ed. P. 2. Moscow; 2018 (in Russ.).
22. General pharmacopoeia monograph 1.7.2.0004.15. Potency assay of tetanus vaccine (adsorbed). The State Pharmacopoeia of Russian Federation 14 ed. P. 2. Moscow; 2018 (in Russ.).
23. Pharmacopoeia monograph 3.3.1.0003.15 Diphtheria and tetanus vaccine (adsorbed, reduced antigens content). The State Pharmacopoeia of Russian Federation 14 ed. P. 4. Moscow; 2018 (in Russ.).
24. Pharmacopoeia monograph 3.3.1.0004.15 Diphtheria vaccine (adsorbed, reduced antigens content). The State Pharmacopoeia of Russian Federation 14 ed. P. 4. Moscow; 2018 (in Russ.).
25. Assay of diphtheria vaccine (adsorbed), general chapter 2.7.6 version 01/2008:20706. Ph. Eur. 10th Edition. Strasbourg, France: Council of Europe; European Pharmacopoeia online. Available at: www.pheur.edqm.eu/home
26. Assay of tetanus vaccine (adsorbed), general chapter 2.7.8 version 01/2008:20708. Ph. Eur. 10th Edition. Strasbourg, France: Council of Europe; European Pharmacopoeia online. Available at: www.pheur.edqm.eu/home
27. Minimum requirements for biological products National Institute of Infectious Diseases Japan, 2006. Available at: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/methods/biologics/vaccine/japan-minreqs.pdf>
28. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO/BS/09.2123. Collaborative Study: Calibration of Replacement WHO International Standard for Diphtheria Toxoid Adsorbed.
29. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO/BS/10.2150. International Collaborative Study: Calibration of Replacement WHO International Standard for Tetanus Toxoid Adsorbed.

Об авторах

- **Елена Игоревна Комаровская** – ведущий эксперт лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Москва, Россия. +7 (499) 190-18-18 (64-08), Komarovskaya@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9035-6072>
- **Ольга Викторовна Перельгина** – к. м. н., начальник лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Москва, Россия. +7 (499) 190-18-18 (64-15), Perelgina@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5029-3751>

Поступила: 19.01.2022. Принята к печати: 01.03.2022.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- **Elena I. Komarovskaya** – Leading Expert of the Laboratory for Toxoids and Antitoxic Sera, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia. +7 (499) 190-18-18 (64-08), Komarovskaya@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9035-6072>
- **Olga V. Perelygina** – Cand. Sci. (Med.), Head of the laboratory for Toxoids and Antitoxic Sera, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia. +7 (499) 190-18-18 (64-08), Perelgina@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5029-3751>

Received: 19.01.2022. Accepted: 01.03.2022.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.