

Определение специфической активности дифтерийного анатоксина в комбинированных вакцинах методом кожно-некротических проб

Е. И. Комаровская*, О. В. Перелыгина

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва

Резюме

Актуальность. В последние годы в Европейском союзе ведется политика, направленная на снижение использования животных в исследованиях, в т. ч. фармацевтических. В рамках данного подхода предлагаются альтернативные методы оценки иммуногенности, в частности, дифтерийного анатоксина, к примеру, метод кожно-некротических проб (intradermal challenge test). Специфическая активность дифтерийного анатоксина данным методом оценивается по его способности защищать иммунизированных животных от дермoneкротического действия дифтерийного токсина. **Цель.** Сравнение методов летального заражения и кожно-некротических проб для определения специфической активности дифтерийного анатоксина в комбинированных вакцинах и анатоксинах российского производства. **Материалы и методы.** В работе использовались отечественные и зарубежные комбинированные вакцины и анатоксины для профилактики дифтерии, дифтерийные токсины, референс-препараты. Определение специфической активности дифтерийного анатоксина проводили на морских свинках фармакопейными методами: летального заражения и кожно-некротических проб. **Результаты.** Для оценки специфической активности дифтерийного анатоксина использована методика, соответствующая рекомендациям ВОЗ, для этого были подобраны морские свинки, аналогичные по чувствительности к дифтерийному токсину свинкам Dunkin Hartley, и проведены сравнительные испытания методов кожно-некротических проб и летального заражения для определения специфической активности дифтерийного анатоксина. **Выводы.** Результаты исследования продемонстрировали принципиальную возможность применения метода кожно-некротических проб для оценки специфической активности дифтерийного анатоксина. Однако по ряду факторов, таких как вариабельность результатов, количество животных и др., метод кожно-некротических проб уступает методу летального заражения при оценке специфической активности дифтерийного анатоксина в рутинной практике.

Ключевые слова: дифтерийный анатоксин, иммуногенность дифтерийного анатоксина, летальное заражение, дифтерийный токсин, дермoneкротическое действие, дифтерийная эритема, кожная проба, АКДС-вакцина, метод Ремера, метод кожно-некротических проб

Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Комаровская Е. И., Перелыгина О. В. Определение специфической активности дифтерийного анатоксина в комбинированных вакцинах методом кожно-некротических проб. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2023;22(4):12-23. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2023-22-4-12-23>

Благодарность

Коллективу лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов ФГБУ «НЦЭСМП» за помощь в выполнении экспериментальной части: инженерам-лаборантам Кудряшовой А.И., Вавиловой Е.В., Увицкой Л.Е.* Терешкиной Н.В. экспертизу I категории управления экспертизы безопасности ЛС ФГБУ «НЦЭСМП» за помощь в работе с патматериалом животных.

Assay of Diphtheria Vaccine Potency by Intradermal Challenge Test

El Komarovskaya**, OV Perelygina

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

Abstract

Relevance. Modern identifying potency (immunogenicity) of diphtheria 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) 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 diphtheria toxin. This method is used as "golden standard".

* Для переписки: Комаровская Елена Игоревна, ведущий эксперт лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Москва, 127051, 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, 8/2 Petrovskii Blvd, Moscow, 127051, Russian Federation. +7 (499) 190-18-18 (64-08), Komarovskaya@expmed.ru. ©Komarovskaya EI, et al.

Last decade European Union Regulatory politic is headed to reduce of using animals in pharmaceutical practice, "The Three Rs" approach. In frameworks of this approach alternative methods of evaluating immunogenicity DT were purposed, particularly, intradermal challenge method. Within this test the potency of diphtheria toxoid is evaluated by its possibility to protect immunized animals from intradermal administration of diphtheria toxin. In the production of a number of foreign vaccines intradermal challenge test is used for assessing potency. **Aim.** Comparative characteristics of methods of lethal challenge test and intradermal challenge tests to determine the potency of diphtheria toxoid in combined vaccines and toxoids made in Russia. **Materials and methods.** Materials of domestic and foreign manufacturers were used in the work: combined vaccines for diphtheria prevention, diphtheria toxins, reference-vaccine. The determination of the potency of diphtheria toxoid was carried out on guinea pigs by pharmacopoeias methods: lethal challenge test and intradermal challenge tests. **Results.** To assess the potency of diphtheria toxoid using, a technique was used in accordance with WHO recommendations; for this, guinea pigs similar in sensitivity to diphtheria toxin to Dunkin Hartley pigs were selected. The suitability of the diphtheria toxin used in Russia for determining the potency of diphtheria toxoid by the method of intradermal challenge test was assessed when evaluating the effectiveness of vaccines for the prevention of diphtheria. Comparative tests of the intradermal challenge tests and lethal challenge tests were carried out to determine the potency of diphtheria toxoid. **Conclusions.** The conducted studies have demonstrated the fundamental possibility of using the intradermal challenge tests to assess the potency of diphtheria toxoid. However, for a number of factors, such as the variability of results, the number of animals, etc., the intradermal challenge tests is inferior to the method of lethal challenge tests in assessing the potency of diphtheria vaccines in routine practice.

Keywords: diphtheria toxoid, challenge potency test for diphtheria vaccine, lethal challenge method, diphtheria toxin, erythrogenic toxic effect, specific diphtheria erythema, DTwP-vaccine, the Roemer method, intradermal challenge method
No conflict of interest to declare.

For citation: Komarovskaya EI, Pereglyna OV. Assay of diphtheria vaccine potency by intradermal challenge test. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2023;22(3):12-23 (In Russ.). <https://doi:10.31631/2073-3046-2023-22-4-12-23>

Acknowledgments

Graitude to Soldatov A. for reviewing of the text. Graitude to the Laboratory team for the help of the experimental part: lab assistants Kudryashova A., Vavilina E., Uvitzkaya L. Graitude to Tereshkina N. for help in post-mortem examination of animals.

Введение

Традиционным методом определения специфической активности (иммуногенности) дифтерийного анатоксина (ДА) является тест, основанный на способности дифтерийного анатоксина защищать иммунизированных морских свинок от заражения летальной дозой дифтерийного токсина – метод летального заражения. Специфическую активность рассчитывают путем сопоставления количества ДА в испытуемом и референс-препарате (калиброваны в международных единицах – МЕ), вызывающих одинаковый защитный эффект. Для расчета используют соответствующие статистические методы. Метод летального заражения может быть применен на всех стадиях производства вакцины и является «золотым стандартом» [1].

Политика Европейского агентства по лекарственным средствам (ЕМА) в Европейском союзе в течение последних десятилетий направлена на снижение количества животных в экспериментах, что нашло отражение в директиве Евросоюза «О защите животных, используемых для научных целей» [2]. При этом была разработана концепция «The Three Rs» (3Rs), в основе которой предложены замена, усовершенствование и сокращение (replacement, refinement, reduction) как основные пути снижения количества животных в эксперименте и/или минимизация их страданий. В соответствии с данной тенденцией были разработаны и включены в Европейскую фармакопею альтернативные методы оценки специфической активности дифтерийного анатоксина – метод

кожно-некротических проб (intradermal challenge test) и серологические методы: иммуноферментный анализ (ИФА) и на культуре клеток Vero [3]. Специфическую активность дифтерийного анатоксина методом кожно-некротических проб определяют по его способности защищать иммунизированных животных от дермoneкротического действия дифтерийного токсина, вводимого интрадермально. Кожная реакция в месте введения токсина может отсутствовать или проявляться в виде эритемы, инфильтрата или некроза. Иммунохимические методы основаны на определении в сыворотке крови иммунизированных животных защитных антител.

Эти методы применяют как в процессе производства препаратов, так и в рутинном контроле при выпуске вакцин. ЕМА проводит политику по полному отказу от *in vivo* тестов и переход на тесты *in vitro* [4–8].

Учитывая данную тенденцию ЕМА, зарубежные производители вакцин, зарегистрированных в России, в нормативной документации для определения специфической активности метод летального заражения указывают в качестве альтернативного метода, а в качестве основного – методы кожно-некротических проб или ИФА. При этом арбитражными являются методы, используемые производителем.

В связи с этим, а также с тем, что в мире активно развиваются альтернативные методы контроля иммуногенности, очевидна актуальность оценки современных методик для возможного их использования в России и для гармонизации с ведущими

Original Articles

фармакопеей мира, а также повышения конкурентоспособности вакцин российского производства.

Цель данного исследования – сравнение методов летального заражения и кожно-некротических проб для определения специфической активности комбинированных вакцин и анатоксинов российского производства.

Для достижения цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Определить возможность использования морских свинок из отечественных питомников.
2. Установить пригодность для данного метода дифтерийного токсина, используемого российскими производителями при оценке специфической активности лекарственных средств для профилактики и лечения дифтерии.
3. Провести сравнительные испытания метода кожно-некротических для определения специфической активности ДА относительно метода летального заражения («золотого стандарта»).

Материалы:

- Отраслевой стандартный образец (ОСО) активности адсорбированного дифтерийного анатоксина 42-28-250. Специфическая (иммуногенная) активность 330 МЕ/ампула (ФГБУ НЦЭСМП МЗ РФ);
- Diphtheria Vaccine (adsorbed) BRP (референс-препарат дифтерийной вакцины (адсорбированной), серия 4.5, 97 МЕ/ампула (European Pharmacopoeia Reference Standard, кат. № D2700000, EDQM);
- Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная (АКДС-вакцина), суспензия для внутримышечного введения, 0,5 мл/доза (с консервантом) (АО «НПО «Микроген», Россия);
- Анатоксин дифтерийно-столбнячный очищенный адсорбированный жидкий (АДС-анатоксин), суспензия для внутримышечного введения, 0,5 мл/доза (с консервантом) (АО «НПО «Микроген», Россия);
- Инфанрикс®, вакцина для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша (бесклеточная) трехкомпонентная адсорбированная жидкая (ГлаксоСмитКляйн, Бельгия/Россия);
- Пентаксим®, вакцина для профилактики дифтерии и столбняка адсорбированная, коклюша ацеллюлярная, полиомиелита инактивированная, инфекции, вызываемой *Haemophilus influenza* тип b конъюгированная (Санофи Пастер, Франция);
- Очищенный дифтерийный токсин (антигенная активность 110 Лф/мл, Лр/100 – 73, Санофи Пастер, Франция);
- Дифтерийный токсин (АО «НПО «Микроген», Россия);
- Морские свинки аутбредные (самцы и самки, весом от 250 г до 300 г), питомник РФ, Московская область, Солнечногорский район, рп Андреевка, Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Лабораторные животные были выращены в условиях конвенционального вивария ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. В период проведения исследования животных содержали в изолированном помещении конвенционального вивария при температуре 22–24 °С и относительной влажности воздуха не выше 60% в условиях свободного доступа к корму и воде на стандартном рационе кормления. При проведении экспериментов соблюдали общепринятые этические нормы обращения с животными на основе стандартных операционных процедур, которые соответствуют основному регулирующему стандарту в области надлежащей лабораторной практики и Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [9,10].

Методы:

Метод кожно-некротических проб использовался в соответствии с рекомендациями ВОЗ [1].

Животных (по 8 голов в каждой группе – всего 6 групп) иммунизировали эквивалентными дозами референс-препарата (калиброванный в МЕ) и испытуемой вакциной в объеме 1,0 мл подкожно в область грудины.

Через 28 дней проводили инъекции провокационных проб токсина в соответствующих концентрациях. За 3 часа до инъекций с обоих боков удаляли волосяной покров (шерсть и подшерсток) при помощи машинки для стрижки (Moser, Германия) с последующим применением крема-депилятора (Veet, Франция). Непосредственно перед проведением инъекций готовили серию разведений провокационных доз токсина. Предварительно токсин разводили до концентрации 0,256 Лф/мл (0,0512 Лф в 0,2 мл). Используя этот раствор токсина, делали серию 4-кратных разведений, содержащих 0,0128, 0,0032, 0,0008, 0,0002 и 0,00005 Лф в 0,2 мл. Для контрольной группы животных готовили разведения токсина, содержащие 80, 40, 20, 10 и 5 10^6 Лф в 0,2 мл (табл. 1).

Токсин для контрольного заражения должен выдерживать следующие требования: содержать от 67 до 133 Лр/100 в 1 Лф и от 25 000 до 50 000 минимальных реагирующих доз (minimal reactive dose (MRD)) при внутрикожном введении морской свинке в 1 Лф; иметь чистоту не менее 1500 Лф на мг белкового (недиализируемого) азота.

При этом:

Лр/100 – минимальное количество токсина, которое в смеси с 0,01 МЕ противодифтерийной сыворотки при внутрикожном введении морским свинкам вызывает специфическую эритему диаметром 10 мм через 36–48 часов.

MRD – за минимальную реагирующую дозу принимают наименьшее количество токсина в объеме 0,1 мл, которое через 48 часов вызывает специфическую дифтерийную эритему более чем у 50% животных.

В соответствии с нижеприведенной схемой (рис. 1) каждой иммунизированной морской свинке вводили внутрикожно по 0,2 мл каждого из шести растворов провокационного токсина (растворы I–VI

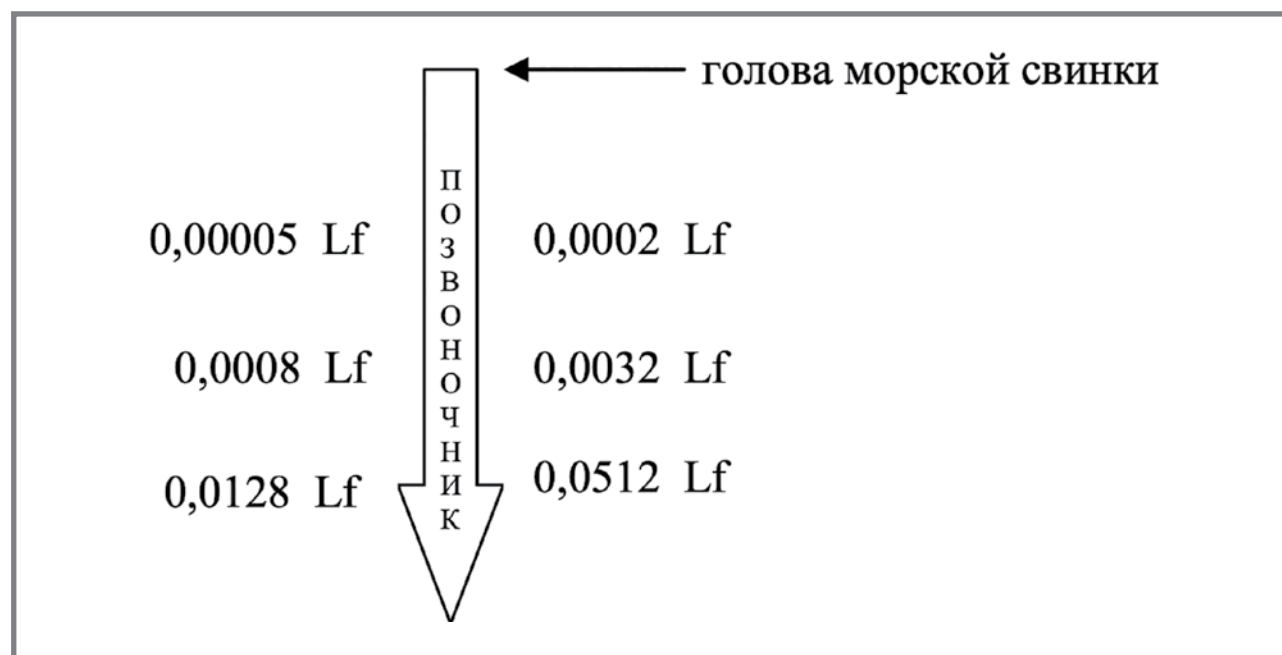
Таблица 1. Схема приготовления растворов провокационного токсина для внутрикожного введения и ожидаемая кожная реакция

Table 1. Scheme of toxin dilution for intradermal challenge method and the expected skin reaction

Номер раствора Solution's number	Доза токсина, (Lf/0,2 мл) Toxin Concentration Lf/0,2 мл	Ожидаемая кожная реакция у иммунизированных животных Expected skin reaction in immunized animals
I	0,0512	Дифтерийная эритема, некроз/отсутствие кожной реакции Specific diphtheria erythema, necrosis / no skin reaction
II	0,0128	Дифтерийная эритема, некроз/отсутствие кожной реакции Specific diphtheria erythema, necrosis / no skin reaction
III	0,0032	Дифтерийная эритема, некроз/отсутствие кожной реакции Specific diphtheria erythema, necrosis / no skin reaction
IV	0,0008	Дифтерийная эритема, некроз/отсутствие кожной реакции Specific diphtheria erythema, necrosis / no skin reaction
V	0,0002	Дифтерийная эритема, некроз/отсутствие кожной реакции Specific diphtheria erythema, necrosis / no skin reaction
VI	0,00005	Дифтерийная эритема, некроз/отсутствие кожной реакции Specific diphtheria erythema, necrosis/no skin reaction
		Критерии приемлемости для контрольной группы животных Criteria of validity for control group of animals
VII	80×10^{-6} (0,00008)	У 100% животных должны наблюдаться признаки дифтерийной эритемы 100% of animals have a specific diphtheria erythema
VIII	40×10^{-6} (0,00004)	Не менее чем у 80% животных должны наблюдаться признаки дифтерийной эритемы At least 80% of animals have a specific diphtheria erythema
IX	20×10^{-6} (0,00002)	Не более чем у 20% животных должны наблюдаться признаки дифтерийной эритемы Not more than 20% of animals have a specific diphtheria erythema
X	10×10^{-6} (0,00001)	У 100% животных не должно наблюдаться признаков дифтерийной эритемы 100% of animals don't have a specific diphtheria erythema
XI	5×10^{-6} (0,000005)	У 100% животных не должно наблюдаться признаков дифтерийной эритемы 100% of animals don't have a specific diphtheria erythema

Рисунок 1. Схема введения дифтерийного токсина

Figure 1. Administration of diphtheria toxin



таким образом, чтобы свести к минимуму интерференцию между соседними участками (для 6 разведений токсина – по три внутрикожных инъекции в разные места на каждый бок):

Через 24 и 48 часов после инъекции токсина оценивали степень развития специфической кожной реакции. Каждое место провокации измеряли и регистрировали величину эритемы, инфильтрата и некроза.

Учет результатов испытания проводили через 48 часов после инъекции токсина (на 30-й день исследования) в соответствии со следующими критериями:

1. Эритема диаметром менее 5 мм принимается за отрицательную реакцию.
2. Реакция является положительной при диаметре эритемы 5 мм и более.
3. Интенсивность специфической дифтерийной эритемы и/или некроза должна иметь дозозависимый характер.
4. Наличие признаков специфической дифтерийной эритемы и/или некроза является положительной реакцией, места провокации считают незащищенными.
5. При отсутствии признаков специфической дифтерийной эритемы и/или некроза места провокации считают защищенными.
6. Если после инъекции токсина животное погибает, его считают незащищенным.

Для каждого животного записывают количество защищенных мест («intradermal challenge score»). Значение количества защищенных мест определяют как индекс индивидуальной защиты «ИЗ». Например, животному с положительной реакцией в каждом месте инъекции присваивается индекс «0» – отсутствие защиты; животному с одной положительной и пятью отрицательными реакциями присваивают индекс «1» и т.д. Количество защищенных мест у животных одной группы суммируют для дальнейшего преобразования.

Определение валидности испытания

Испытание является валидным, если соблюдаются следующие условия:

- a. Отношение общего количества защищенных мест к числу животных, иммунизированных минимальной дозой референс-препарата и вакциной, должно быть меньше 3.
- b. Отношение общего количества защищенных мест к числу животных, иммунизированных максимальной дозой референс-препарата и вакциной, должно быть больше 3.
- c. Реакции контрольных животных должны соответствовать установленным требованиям (см. табл. 1).

Если испытание признано валидным, индивидуальные ответы каждого животного (А) преобразовывают с помощью формулы углового преобразования (критерий Фишера ϕ):

$$(A) = 2 \cdot \arcsin (ИЗ/6)^{1/2},$$

где: ИЗ – индекс индивидуальной защиты (количество защищенных мест («intradermal challenge score»), 6 – суммарное количество мест инъекций провокационного токсина.

Индивидуальные ответы животных (А), получивших одно и то же разведение вакцины, затем используют для расчета иммуногенной активности вакцины методом параллельных линий, согласно Европейской фармакопее [11], при помощи соответствующего статистического обеспечения. Тест действителен, если статистический анализ не показывает отклонений от линейности или параллелизма на уровне значимости 5% ($p < 0,05$). За окончательный результат испытания принимают значение нижнего предела доверительного интервала измеренной активности испытуемой вакцины в достоверном определении [1].

Если испытание признано недостоверным, его повторяют. Согласно Европейской фармакопее допускается проведение повторных испытаний. Результаты всех валидных испытаний при расчете специфической активности должны быть объединены [3].

Метод летального заражения

Морские свинки (по 10 голов в каждой группе), иммунизированные эквивалентными дозами референс-препарата (калиброванный в МЕ) и испытуемой вакциной в объеме 1,0 мл подкожно в область грудины, контрольная группа – неиммунизированные животные – 15 свинок (3 группы по 5 голов). Через 28 дней иммунизированным животным подкожно вводят заражающую дозу дифтерийного токсина (100 Ld_{50} /мл), неиммунизированным животным – соответственно 2 Ld_{50} /мл, 1 Ld_{50} /мл, 0,5 Ld_{50} /мл дифтерийного токсина.

На основании полученных результатов рассчитывают иммуногенную активность ДА по формуле Кербера: определяют величины ED_{50} для референс-препарата (в МЕ) и испытуемой вакцины (в мл) и показатель активности ДА (в МЕ/мл), а также истинное количество LD_{50} введенного дифтерийного токсина.

Формула Кербера:

$$\lg ED_{50} = \lg D_N - \sigma(\sum Li - 0.5),$$

где: – величина максимальной из испытанных доз; σ – логарифм кратности разведения (отношение большей дозы к следующей за ней меньшей дозе); Li – отношение количества выживших животных к общему числу животных, получивших данную дозу; $\sum Li$ – сумма значений Li , найденных для всех испытываемых доз; LD_{50} токсина, введенного животным, рассчитывают по той же формуле, в которой Li – отношение количества павших животных к общему числу животных, получивших данную дозу токсина.

Специфическая активность дифтерийного анатоксина должна быть не менее 60 МЕ/мл. Разрешающая доза введенного токсина должна быть приблизительно равна 100 LD_{50} [12].

Результаты

Определение возможности использования морских свинок, доступных в России

В испытаниях используют аутбредных морских свинок Dunkin Hartley (Charles River Laboratories, Франция или Envigo, Нидерланды). Морские свинки Dunkin Hartley являются акромеланическими альбиносами, имеют белый окрас шерсти и красные глаза. По данным Marshall BioResources (США), крупнейшего мирового поставщика животных для биомедицинских исследований, свинки Dunkin Hartley получены в институте Pirbright (Великобритания) от короткошерстной английской морской свинки и являются универсальной биологической моделью.

В настоящее время морские свинки Dunkin Hartley не представлены в питомниках России. В нашей стране доступны аутбредные морские свинки смешанного окраса. Белых морских свинок, не альбиносов, в России используют для определения специфической активности противодифтерийной сыворотки методом Ремера (токсин-нейтрализующий тест, выполняют внутрикожные инъекции). В данном методе не рекомендовано использовать альбиносов ввиду их гиперчувствительности. На основании вышеизложенного было принято решение использовать белых морских свинок, не альбиносов, для оценки возможности применения в методе кожно-некротических проб.

Морские свинки были разделены на шесть групп по 8 голов в каждой. Три группы иммунизировали

референс-вакциной (EDQM), разведенной до 6 МЕ/мл, 3 МЕ/мл, 1,5 МЕ/мл, и три группы вакциной Пентаксим (Санофи Пастер, Франция), разведенной аналогично. Для контроля токсина сформировали группу из пяти неиммунизированных морских свинок. Через 28 дней проводили внутрикожные инъекции провокационных доз дифтерийного токсина (производство Санофи Пастер, Франция). Через 48 часов учитывали результаты испытания.

У всех животных были зарегистрированы тяжелые кожные реакции: эритемы с обширными болезненными инфильтратами до 25 мм в диаметре, тяжелейшие некрозы более 16 мм в диаметре, сливающиеся друг с другом и причиняющие сильнейшие страдания (рис. 2 б), и общее недомогание: апатия, отказ от еды, существенное снижение двигательной активности. Степень специфической дифтерийной эритемы и некроза у каждого животного имели дозозависимый характер (рис. 2 а, б).

Для того чтобы перейти к преобразованию ответа каждого животного – величине А, определили соответствие опыта критериям приемлемости. Результаты представлены в таблицах 2 и 3.

Исходя из полученных результатов, дальнейшее проведение преобразований, статистического анализа и расчета величины ED_{50} невозможно, т.к. испытание не соответствует следующим критериям приемлемости:

- 1) значение общего количества защищенных мест к числу животных в группе иммунизированных максимальной дозой референс-вакцины составило меньше 3;

Рисунок 2. Дермoneкротическое действие дифтерийного токсина. Фото Е. И. Комаровской
Figure 2. Erythrogenic toxic effect of diphtheria toxin (foto EI Komarovskaya)

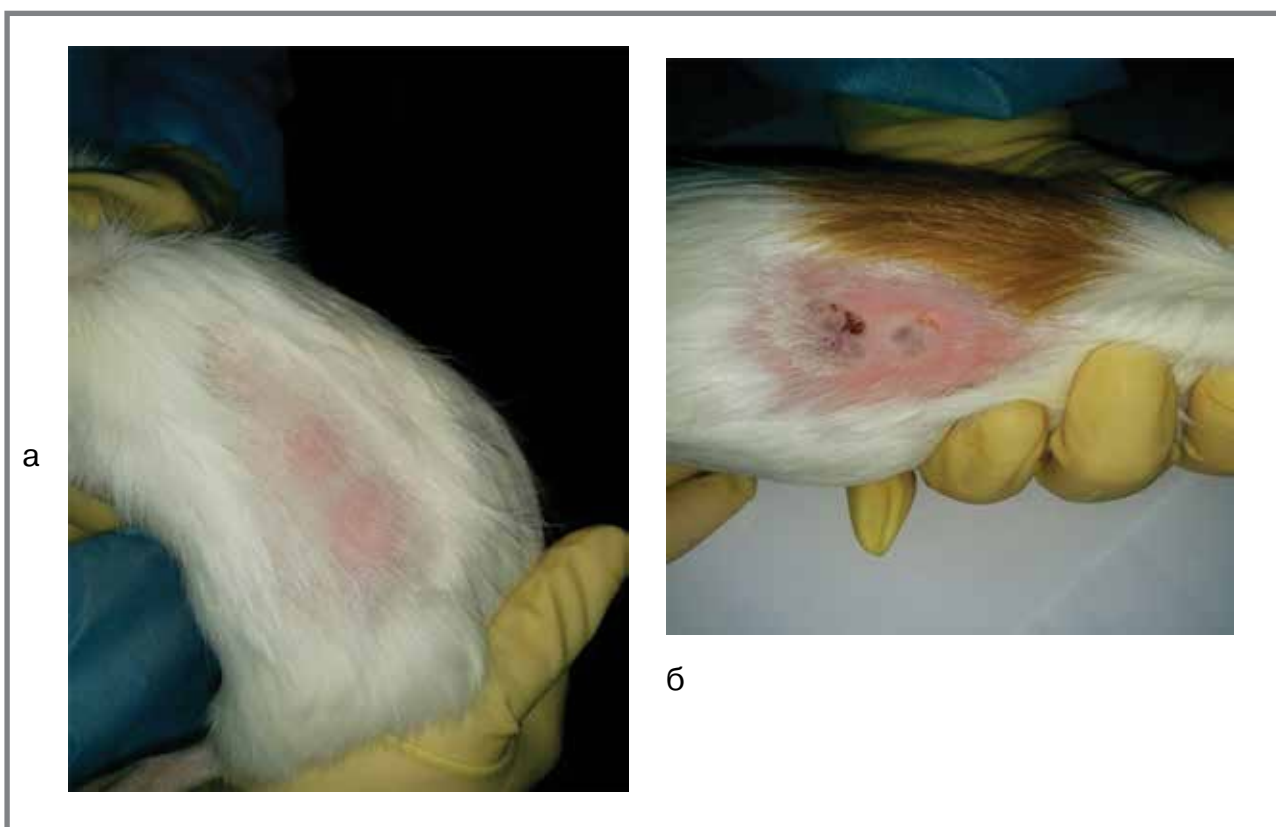


Таблица 2. Отношение общего количества защищенных мест (ИЗ) к числу животных в группах, иммунизированных максимальной и минимальной дозами референс-вакцины и исследуемой вакцины
Table 2. The ratio of the total number of protected sites (PS) to the number of animals in groups immunized with the maximum and minimum doses of the reference-vaccine and test vaccine

Доза препарата Dose of vaccine	Требования к ИЗ Requirements to (PS)	Референс-вакцина Reference-vaccine	Исследуемая вакцина Test vaccine
6 МЕ/мл 6 IU/ml	Больше 3 More than 3	1,6	3,1
1,5 МЕ/мл 1.5 IU/ml	Меньше 3 Less than 3	1,25	1,1

Таблица 3. Результаты кожной реакции животных контрольной группы
Table 3. Results of the skin reaction of animals in control group

№ р-ра про- вокационно- го токсина Solution's number	Результат кожной реакции Skinreaction	Соответствие/несоответствие критериям приемлемости Validity of the test
VII	У 100% животных зарегистрировано отсутствие признаков дифтерийной эритемы 100% of animals don't have a specific diphtheria erythema	Несоответствие Not valid
VIII	У 100% животных зарегистрировано отсутствие признаков дифтерийной эритемы 100% of animals don't have a specific diphtheria erythema	Несоответствие Not valid
IX	У 100% животных зарегистрировано отсутствие признаков дифтерийной эритемы 100% of animals don't have a specific diphtheria erythema	Несоответствие Not valid
X	У 100% животных зарегистрировано отсутствие признаков дифтерийной эритемы 100% of animals have a specific diphtheria erythema	Соответствие Valid
XI	У 100% животных зарегистрировано отсутствие признаков дифтерийной эритемы 100% of animals have a specific diphtheria erythema	Соответствие Valid

2) в контрольной группе животных от доз «VII», «VIII» и «IX» признаки дифтерийной эритемы не наблюдались.

Несмотря на полученный результат, проведенный опыт продемонстрировал возможность использования морских свинок, представленных в нашей стране, для данного метода и необходимость уделить особое внимание выбору дифтерийного токсина для данного теста.

Определение пригодности дифтерийного токсина, используемого российскими производителями при оценке специфической активности лекарственных средств для профилактики и лечения дифтерии

Для выбора дифтерийного токсина, соответствующего требованиям метода, проводили титрование образцов токсина, полученных от производителей ФГУП «НПО «Микроген», Россия (токсин «Р»), относительно токсина, представленного компанией Санофи Пастер, Франция (токсин «Ф»). Использованы аутбредные морские свинки белого окраса, не альбиносы.

Для образца дифтерийного токсина «Р» была установлена величина антигенной активности – 65 Лф/мл, Лр/100 – 130, МРД – 3000.

Определив характеристики токсина, проводили исследование для определения возможности его использования в методе кожно-некротических проб на ограниченном количестве животных. Для этого использовали животных, иммунизированных АКДС-вакциной, АДС-анатоксином и ОСО адсорбированного дифтерийного анатоксина, и четыре неиммунизированных морских свинки (контрольная группа). Препараты, разведенные до содержания дифтерийного анатоксина 2 МЕ/мл, вводили подкожно в объеме 1 мл. Через 28 суток проводили введение провокационных доз токсина (опытная доза токсина «Ф» для внутрикожного введения была скорректирована в предварительных опытах). Разведение дифтерийного токсина «Р» показано в таблице 1. Животных контролировали через 24 и 48 часов, фиксировали развитие признаков дифтерийной эритемы и некроза. Через 48 часов учитывали результаты. Иммунизированные животные имели умеренные проявления дифтерийной эритемы величиной от 6 до 13 мм, некоторые с небольшими инфильтратами, у двух свинок в месте инъекции наибольшей концентрации токсина зарегистрированы эритемы величиной 18–22 мм с инфильтратом и небольшими очагами некроза.

У каждого животного признаки дифтерийной эритемы имели дозозависимый характер. Для контрольной группы животных были получены результаты, удовлетворяющие критериям приемлемости. Расчет индекса индивидуальной защиты *ИЗ* в данном опыте не предусматривался.

В следующем испытании по подтверждению возможности применения дифтерийного токсина использовали АКДС-вакцину, АДС-анатоксин, Инфанрикс и ОСО адсорбированного дифтерийного анатоксина 330 МЕ/мл. Каждым препаратом иммунизировали 5 морских свинок. Препараты разводили до содержания дифтерийного анатоксина 2 МЕ/мл. На 28-е сутки проводили введение провокационных доз токсина (см. табл. 1). Животных контролировали через 24 и 48 часов, регистрировали кожные реакции. У животных, иммунизированных препаратами для профилактики дифтерии, зафиксированы эритемы с максимальным диаметром 10 мм, инфильтраты и некрозы отсутствовали. В группе иммунизированных ОСО зафиксированы эритемы диаметром от 14 до 20 мм, с инфильтратами и некрозами до 5 мм. Во всех группах у каждого из животных наблюдался дозозависимый эффект. Определили индекс *ИЗ* у каждого животного в каждой группе. Испытание соответствовало критериям приемлемости. Контрольная группа животных полностью соответствовала критериям приемлемости. С помощью формулы углового преобразования рассчитали индивидуальные ответы «А» каждого животного. Дальнейшая статистическая обработка данных не предусматривалась.

На основании полученных результатов было принято решение о возможном применении токсина «Р» производства ФГУП «НПО «Микроген», Россия.

Следующее испытание по определению специфической активности ДА в вакцине Пентаксим (той же серии, что и в первом опыте) проводили с использованием токсина «Р». В качестве референс-препарата использовали вакцину EDQM. Препараты разводили до содержания дифтерийного анатоксина: 6 МЕ/мл, 3 МЕ/мл, 1,5 МЕ/мл, 0,75 МЕ/мл. Иммунизировали по 8 морских свинок в каждой группе, контрольная группа – 5 свинок. Через 28 суток проводили инъекции провокационных доз токсина (см. табл. 1). Животных контролировали через 24 и 48 часов. Через 48 часов после введения провокационных доз токсина зафиксировали падеж животных. В группе животных, иммунизированных

референс-препаратом, пало 18 голов (56%), в группе иммунизированных испытуемым препаратом – 17 голов (53%). Общее количество павших животных – 35 голов, что составило 55% от общего количества иммунизированных морских свинок. Павшим животным был присвоен индекс индивидуальной защиты «0». У выживших морских свинок признаки дифтерийной эритемы имели дозозависимый характер не у каждой особи, таким животным присваивали индекс индивидуальной защиты «0». Зафиксированы эритемы величиной до 20 мм, инфильтраты до 16 мм, размер некроза у двух свинок достигал 22 мм, другие некрозы имели величину до 10 мм. У каждого животного регистрировали индекс *ИЗ*. Значение отношения общего числа защищенных мест к числу животных в группах, иммунизированных максимальной и минимальной дозами для стандартной и испытуемой вакцин представлены в таблице 4.

В группе контрольных животных, получивших дозу токсина «VII» и «IX», критерии приемлемости не были соблюдены.

Исходя из результатов, опыт не валиден, т.к. не соответствует следующим критериям приемлемости:

1. значение общего числа защищенных мест к числу животных в группе иммунизированных максимальной дозой референс-вакцины составило меньше 3;
2. в контрольной группе животных от доз «VII», «IX» признаки дифтерийной эритемы не наблюдались.

Следовательно, дальнейшее проведение статистического анализа и расчета величины ED_{50} невозможно.

При вскрытии павших животных макроскопически не наблюдалось признаков патологических изменений надпочечников, сердца, почек, печени, кишечника, брюшины и др. У всех павших свинок на легких были обнаружены патологические изменения в виде кровоизлияний и ярких пятен (рис. 3). Данная картина изменения в легких характерна при развитии токсического шока.

Сравнительные испытания метода кожно-некротических проб относительно метода летального заражения («золотой стандарт»)

После описанного выше опыта, согласно плану исследования, проводили сравнительные испытания показателя специфической активности ДА методом летального заражения («золотой стандарт») и методом кожно-некротических проб.

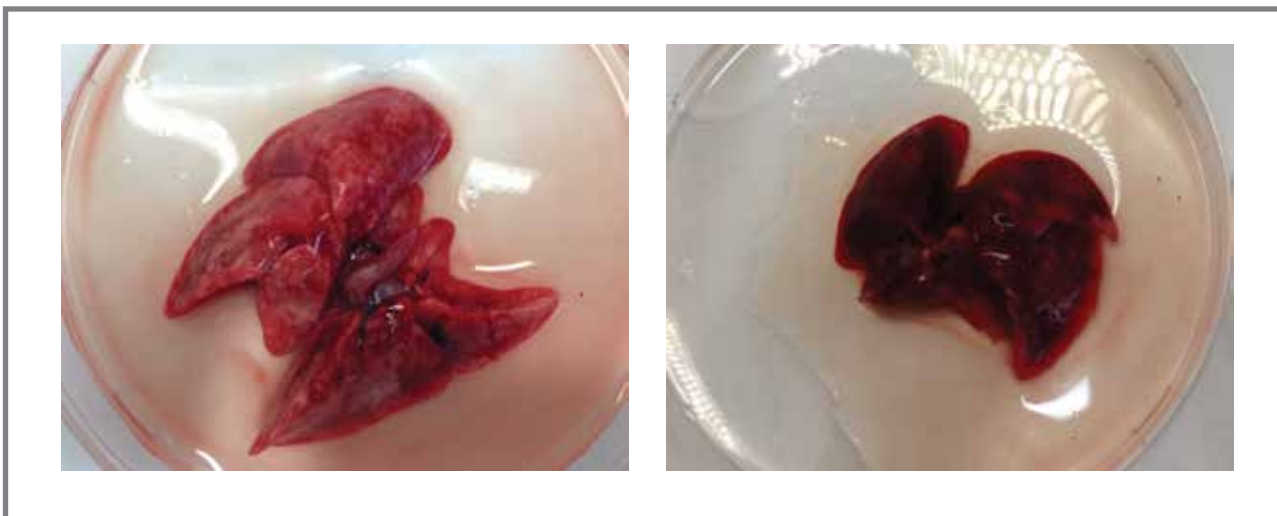
Таблица 4. Отношение общего числа защищенных мест (*ИЗ*) к числу животных в группах, иммунизированных максимальной и минимальной дозами референс-вакцины и исследуемой вакцины (Пентаксим)

Table 4. The ratio of the total number of protected sites (PS) to the number of animals in groups immunized with the maximum and minimum doses of the reference-vaccine and test vaccine (Pentaxim)

Доза препарата Dose of vaccine	Требования к <i>ИЗ</i> Requirements to (PS)	Референс-вакцина Reference-vaccine	Исследуемая вакцина Test vaccine
6 МЕ/мл 6 IU/ml	Больше 3 More than 3	2,6	3,125
0,75 МЕ/мл 0.75 IU/ml	Меньше 3 Less than 3	0	0,75

Рисунок 3. Легкие морских свинок, павших в опыте по определению иммуногенности дифтерийного анатоксина методом кожно-некротических проб (фото Е. И. Комаровской)

Figure 3. Lungs of guinea pigs that died in the experiment to determine the immunogenicity of diphtheria toxoid by intra-dermal challenge method (foto EI Komarovskaya)



Для испытаний обоими методами брали одну и ту же серию АКДС-вакцины. В качестве препарата сравнения использовали ОСО 42-28-250, лиофилизат с активностью 330 МЕ/ампула, токсин «Р».

ОСО разводили до содержания дифтерийного анатоксина – 4 МЕ/мл, 2 МЕ/мл, 1,0 МЕ/мл. Вакцину разводили эквивалентно.

Разведение токсина в опыте методом летального заражения 100 LD_{50} /мл. Разведение токсина в опыте методом кожно-некротических проб – в соответствии с таблицей 1.

Результаты испытаний методом кожно-некротических проб

Через 48 часов после введения провокационных доз токсина зафиксировали падеж животных. В группе иммунизированных референс-препаратом – 10 голов (42%), в группе иммунизированных испытуемым препаратом – 7 голов (29%). Общее количество павших животных – 17 голов, что составило 35% от общего количества иммунизированных морских свинок. Аутопсию не проводили.

У каждого животного регистрировали ИЗ. Признаки дифтерийной эритемы у всех животных носили дозозависимый характер. Контрольная группа полностью соответствовала критериям приемлемости.

Для оценки валидности опыта рассчитали отношение общего числа защищенных мест к числу животных в группах, иммунизированных максимальной и минимальной дозами исследуемого препарата и референс-препарата, результаты представлены в таблице 5.

По результатам испытания опыт не валиден, так как:

1. значение общего числа защищенных мест к числу животных в группе иммунизированных

максимальной дозой референс-вакцины составило меньше 3;

2. значение общего числа защищенных мест к числу животных в группе иммунизированных максимальной дозой исследуемой вакцины составило меньше 3.

Дальнейшее преобразование полученных данных невозможно.

На основании полученных экспериментальных данных по определению специфической активности дифтерийного анатоксина методом кожно-некротических проб было принято решение о нецелесообразности повторения опыта до получения валидных результатов.

Результаты испытаний методом летального заражения («золотой стандарт»)

На основании полученных результатов (табл. 6) испытания рассчитали иммуногенную активность ДА по формуле Кербера, определили величину ED_{50} для испытуемой вакцины, а также истинное количество LD_{50} введенного дифтерийного токсина.

Таким образом, специфическая активность вакцины АКДС – 131 МЕ/мл, иммунизированным животным было введено 107 LD_{50} дифтерийного токсина. Содержание дифтерийного анатоксина в вакцине – 65,5 МЕ/доза (0,5 мл). Следовательно, вакцина соответствует требованиям.

Обсуждение

В опытах по методу кожно-некротических проб применение токсина российского производителя вызвало высокую летальность (до 55% опытных животных). При аутопсии не было зафиксировано поражения надпочечников и сердца как результата действия дифтерийного токсина (алые

Таблица 5. Отношение общего числа защищенных мест (ИЗ) к числу животных в группах, иммунизированных максимальной и минимальной дозами референс-вакцины и исследуемой вакцины (АКДС-вакцина)
Table 5. The ratio of the total number of protected sites (PS) to the number of animals in groups immunized with the maximum and minimum doses of the reference-vaccine and test vaccine (DTP-vaccine)

Доза препарата Dose of vaccine	Требования к ИЗ Requirements to (PS)	Референс-вакцина Reference-vaccine	Исследуемая вакцина Test vaccine
4 МЕ/мл 4 IU/ml	Больше 3 More than 3	1,0	1,25
1 МЕ/мл 1 UI/ml	Меньше 3 Less than 3	0,75	1,38

Таблица 6. Результаты испытания иммуногенной активности дифтерийного анатоксина методом летального заражения
Table 6. Results of testing the immunogenic activity of diphtheria toxoid by lethal challenge method

Наименование препарата Vaccine	Кол-во животных, голов Number of animals		Иммунизирующая доза, МЕ/мл Dose of the vaccine (IU/ml)	Иммунизирующая доза, мл исходного препарата Dose of the vaccine (ml of initial dose)	Доза токсина (LD ₅₀ /мл) Challenge dose (LD ₅₀ /ml)	Выжило/общее число Number of survived/total	Li
	Иммунизированных Immunized	Зараженных Challenged					
испытуемый препарат test vaccine	10	10	-	0,04	100	8/10	0,8000
	10	10	-	0,02	100	4/10	0,4000
	10	10	-	0,01	100	1/10	0,1000
							$\Sigma Li = 1,3000$
ОСО reference-vaccine	10	10	4	-	100	4/10	0,4000
	10	10	2	-	100	3/10	0,3000
	10	10	1	-	100	2/10	0,2000
							$\Sigma Li = 0,900$
						пало/всего number of died/total	
Контроль токсина Toxin	-	5	-	-	2	5/5	1,0000
	-	5	-	-	1	3/5	0,6000
	-	5	-	-	0,5	0/5	0,0000
							$\Sigma Li = 1,6000$

надпочечники, «дифтерийное» сердце), однако характер поражения легких позволяет предположить, что именно введение токсина, даже в столь малых дозах, привело к смерти животных.

Способ получения и очистки дифтерийного токсина на российских предприятиях не менялся с 1970-х гг., он представляет собой очищенную культуральную жидкость и является промежуточным продуктом производства анатоксина. Дифтерийный токсин производства

Санофи Пастер (Франция) – высокоочищенный (согласно паспортным данным производителя). Дифтерийный токсин, используемый в России для контроля специфической активности ДА, по антигенной активности и токсическим свойствам пригоден для использования в тесте с летальным заражением. Тем не менее, степень очистки у сравниваемых токсинов различна. Полученные результаты свидетельствуют о том, что степень очистки дифтерийного токсина российского

производства является критичным фактором в кожно-некротическом тесте.

При внедрении в практику нового метода необходимо доказать его воспроизводимость, стабильность и сопоставимость результатов, полученных методом летального заражения – «золотого стандарта» [1].

По нашим оценкам, метод кожно-некротических проб не обеспечивает стабильную воспроизводимость результатов испытания, обладает значительной вариабельностью.

Из обзора ВОЗ «Коллаборативные испытания по калибровке и утверждению Третьего международного стандарта адсорбированного дифтерийного анатоксина» [13] известно, что определение специфической активности нового стандарта дифтерийного анатоксина осуществляли двумя методами – летального заражения и кожно-некротических проб. В шести лабораториях проводили испытания методом кожно-некротических проб (всего было проведено 16 анализов). В четырнадцати лабораториях – методом летального заражения (проведено 28 анализов). Данные всех исследований анализировали в соответствии с разделом 2.7. Европейской фармакопеи 1997 г. издания. Специалистами ВОЗ из 28 опытов методом летального заражения 5 (18%) были квалифицированы как недействительные из-за нелинейности ответа, в то время как из 16 испытаний методом кожно-некротических проб 7 (44%) признаны невалидными вследствие нелинейности ответа, а также отсутствия параллельности результатов, что еще раз демонстрирует высокие риски получения нестабильных результатов.

Еще одним недостатком кожно-некротического метода является отсутствие методики с использованием одного разведения, соответственно используется большее количество животных как в рутинном контроле, так и на всех стадиях производства (70 морских свинок на один тест). Кроме того, поведение животных во время инъекции токсина, их состояние в последующие двое суток и характер кожных реакций свидетельствуют о том, что метод не является щадящим, гуманным для животных, чем создает проблемы для исследователей, в том числе этические и моральные.

Также необходимо подчеркнуть, что методика достаточно трудоемка. Подготовка животных для проведения инъекций токсина (освобождение от шерсти, фиксация на протяжении всей процедуры, большое количество доз и мест для введения токсина на одно животное) и процесс учета результатов (фиксация животного, страдающего от боли, замер эритемы/некроза) – крайне трудозатратные и длительные по времени процессы, требующие определенных профессиональных навыков и вовлечения большего числа персонала, чем при выполнении испытаний методом летального заражения.

Очевидные преимущества метода летального заражения:

- возможность оценить протективные свойства дифтерийного анатоксина как в монопрепарате, так и в составе комбинированных вакцин в день учета результатов;
- полученные результаты не требуют каких-либо преобразований;
- метод может быть выполнен с одним или тремя разведениями (используют 25 или 75 морских свинок соответственно);
- отсутствие жестких требований к степени очистки токсина;
- стабильность, достоверность и надежность результатов, а также возможность одновременно тестировать несколько серий препаратов;
- метод менее трудозатратен в сравнении с методом кожно-некротических проб.

Заключение

Проведенные исследования по оценке специфической активности дифтерийного токсина с использованием метода кожно-некротических проб позволяют сделать следующие выводы:

1. Морские свинки, доступные на территории России, обладают чувствительностью к внутрикожному введению очищенного дифтерийного токсина, аналогичной у аутбредных морских свинок Dunkin Hartley.
2. Дифтерийный токсин, производимый российскими предприятиями, требует дальнейшей очистки. Для возможности использования метода в российских условиях необходима разработка специальных способов очистки дифтерийного токсина без потери его биологических свойств.
3. Проведенные сравнительные испытания метода кожно-некротических проб и метода летального заражения продемонстрировали принципиальную возможность применения метода кожно-некротических проб. В то же время при использовании данного теста в рутинной практике возникает ряд проблем, обусловленных сложной процедурой подготовки животных, введением одному животному большого количества доз токсина, процессом учета результатов, необходимостью наличия специальных навыков у персонала и риском получения недостоверных результатов в сравнении с методом летального заражения.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

Литература

1. Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines, World Health Organization 2013. Ordering code: WHO/IVB/11.11.
2. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (Text with EEA relevance). Доступно на: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32010L0063>. Ссылка активна на 1 апреля 2022.
3. 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.
4. Sanofi [официальный сайт] Доступно на: <https://www.sanofi.com/en/science-and-innovation/clinical-trials-and-results/responsible-use-of-animals-in-research-and-production>. Ссылка активна на 1 апреля 2022.
5. Sanofi [официальный сайт] Доступно на: <https://www.sanofi.com/-/media/Project/One-Sanofi-Web/Websites/Global/Sanofi-COM/Home/common/docs/our-responsibility/documents-center/factsheets-2020/animal-protection.pdf?la=en>. Ссылка активна на 1 апреля 2022.
6. Pfizer [официальный сайт] Доступно на: <https://www.pfizer.com/science/animals-used-in-research>. Ссылка активна на 1 апреля 2022.
7. GlaxoSmithKline [официальный сайт] Доступно на: <https://us.gsk.com/en-us/research-and-development/our-use-of-animals/the-3rs-in-medicine-research/>. Ссылка активна на 1 апреля 2022.
8. Akkermans A., Chapsal J., Coccia E., et al. Animal testing for vaccines. Implementing replacement, reduction and refinement: challenges and priorities. *Biologicals*. November 2020. Vol. 68, P. 92–107. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2020.07.010>.
9. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS 123). Strasbourg; 1986.
10. Protocol of amendment to the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS No. 170). Strasbourg; 1998.
11. Statistical analysis of results of biological, general chapter 5.3 version 01/2008:50300. Ph. Eur. 10th Edition. Strasbourg, France: Council of Europe; European Pharmacopoeia online, www.pheur.edqm.eu/home.
12. Общая фармакопейная статья 1.7.2.0003.15 Иммуногенность адсорбированного дифтерийного анатоксина. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.
13. Pharmeuropa Special Issue BIO 2000-2, February 2001 Diphtheria Toxoid (adsorbed) - 3rd I.S. and BRP Collaborative Study for the Establishment of Diphtheria Toxoid (Adsorbed) Third International Standard and European Pharmacopoeia Biological Reference Preparation Batch No. 3. Доступно на: <https://www.edqm.eu/medias/fichiers/bsp022.pdf>. Ссылка активна на 1 апреля 2022.

References

1. Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines, World Health Organization 2013. Ordering code: WHO/IVB/11.11.
2. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (Text with EEA relevance). Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32010L0063>. Accessed: 1 Apr. 2022.
3. 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.
4. Sanofi [official website] Available at: <https://www.sanofi.com/en/science-and-innovation/clinical-trials-and-results/responsible-use-of-animals-in-research-and-production>. Accessed: 1 Apr. 2022.
5. Sanofi [official website] Available at: <https://www.sanofi.com/-/media/Project/One-Sanofi-Web/Websites/Global/Sanofi-COM/Home/common/docs/our-responsibility/documents-center/factsheets-2020/animal-protection.pdf?la=en>. Accessed: 1 Apr. 2022.
6. Pfizer [official website] Available at: <https://www.pfizer.com/science/animals-used-in-research>. Accessed: 1 Apr. 2022.
7. GlaxoSmithKline [official website] Available at: <https://us.gsk.com/en-us/research-and-development/our-use-of-animals/the-3rs-in-medicine-research/>. Accessed: 1 Apr. 2022.
8. Akkermans A., Chapsal J., Coccia E., et al. Animal testing for vaccines. Implementing replacement, reduction and refinement: challenges and priorities. *Biologicals*. November 2020. Vol. 68, P. 92–107. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2020.07.010>.
9. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS 123). Strasbourg; 1986.
10. Protocol of amendment to the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS No. 170). Strasbourg; 1998.
11. Statistical analysis of results of biological, general chapter 5.3 version 01/2008:50300. Ph. Eur. 10th Edition. Strasbourg, France: Council of Europe; European Pharmacopoeia online, www.pheur.edqm.eu/home.
12. 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.).
13. Pharmeuropa Special Issue BIO 2000-2, February 2001 Diphtheria Toxoid (adsorbed) - 3rd I.S. and BRP Collaborative Study for the Establishment of Diphtheria Toxoid (Adsorbed) Third International Standard and European Pharmacopoeia Biological Reference Preparation Batch No. 3. Available at: <https://www.edqm.eu/medias/fichiers/bsp022.pdf>. Accessed: 1 Apr. 2022.

Об авторах

- **Елена Игоревна Комаровская** – ведущий эксперт лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов, ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 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», Россия. +7 (499) 190-18-18 (64-15), Pereligina@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5029-3751>.

Поступила: 15.04.2022. Принята к печати: 27.06.2023.

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. +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. +7 (499) 190-18-18 (64-15), Pereligina@expmed.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5029-3751>.

Received: 15.04.2022. Accepted: 27.06.2023.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.