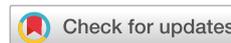


УДК 615.371

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-321-332>

Научная статья | Scientific Article



## Изучение иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксином серологическим методом

Е.И. Комаровская , А.А. Солдатов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Комаровская Елена Игоревна; [komarovskaya@expmed.ru](mailto:komarovskaya@expmed.ru)

### Резюме

**Актуальность.** Современные методы оценки иммуногенности дифтерийного и столбнячного анатоксинов разделяют на две группы: золотой стандарт – с введением токсина иммунизированным животным, и серологические методы – определение уровня защитных антител в сыворотке иммунизированных животных. Международные валидационные исследования серологических методов для определения иммуногенности дифтерийного и столбнячного анатоксинов привели к пересмотру соответствующих глав Руководства Всемирной организации здравоохранения, Европейской и Японской фармакопей. В связи с этим некоторые производители вакцин против дифтерии и столбняка заменили методы с введением токсинов на альтернативные серологические методы в оценке иммуногенности.

**Цель.** Оценить пригодность, воспроизводимость и возможность внедрения в отечественную практику альтернативного метода иммуноферментного анализа при определении иммуногенности дифтерийного и столбнячного компонентов комбинированных вакцин с цельноклеточным коклюшным компонентом; изучить возможность использования отечественных стандартных образцов и реактивов.

**Материалы и методы.** Использовали комбинированные вакцины и анатоксины для профилактики дифтерии, дифтерийный токсин, референс-препараты. Определение специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов проводили на морских свинках и мышах фармакопейными методами: летального заражения и иммуноферментного анализа.

**Результаты.** Получены сопоставимые результаты оценки специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов методами иммуноферментного анализа и летального заражения: 230 МЕ/мл и 264 МЕ/мл, 188 МЕ/мл и 160 МЕ/мл соответственно. Данный серологический метод позволяет использовать одних и тех же особей (в отличие от метода летального заражения) для проверки эффективности нескольких антигенов. Значения титров антител, полученных от каждой особи, при использовании в качестве покрывающих антигенов неадсорбированных дифтерийного и столбнячного анатоксинов отечественного производства оказались сопоставимы с таковыми при использовании в качестве покрывающих антигенов международных стандартов.

**Выводы.** Показана возможность применения метода иммуноферментного анализа для определения специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов в вакцинах против дифтерии и столбняка, содержащих цельноклеточный коклюшный компонент. В качестве покрывающих антигенов возможно использование дифтерийного и столбнячного неадсорбированных анатоксинов отечественного производства. Необходимо продолжить работу по валидации методики иммуноферментного анализа с целью гармонизации отечественных и международных методов оценки иммуногенности дифтерийного и столбнячного анатоксинов, что не только облегчит регистрацию зарубежных вакцин в России, но и ускорит регистрацию отечественных вакцин в других странах.

**Ключевые слова:** дифтерийный и столбнячный анатоксины; оценка иммуногенности; альтернативный метод оценки; метод иммуноферментного анализа; серологический тест ИФА; вакцина против дифтерии; вакцина против столбняка

**Для цитирования:** Комаровская Е.И., Солдатов А.А. Изучение иммунного ответа к дифтерийному и столбнячному анатоксинам серологическим методом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2023;23(3):321–332. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-321-332>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

## Evaluation of the immune response to diphtheria and tetanus toxoids by the serological methods

Elena I. Komarovskaya ✉, Aleksandr A. Soldatov

*Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation*

✉ *Elena I. Komarovskaya; [komarovskaya@expmed.ru](mailto:komarovskaya@expmed.ru)*

### Abstract

**Scientific relevance.** Currently, two types of methods are used to evaluate the potency of diphtheria and tetanus toxoids: the gold standard, which involves administering toxins to immunised animals, and serological methods, which involve quantifying protective antibodies in the serum of immunised animals. International validation studies of serological methods for assessing the potency of diphtheria and tetanus toxoids have resulted in revisions to the relevant chapters of the WHO Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines, as well as the European, Japanese, and several other pharmacopoeias. Consequently, some diphtheria and tetanus vaccine manufacturers have substituted the potency evaluation methods that require administering toxins to animals with alternative serological methods.

**Aim.** The study aimed to assess the suitability, reproducibility, and feasibility of an alternative enzyme immunoassay method (ELISA) for assessing the potency of diphtheria and tetanus components of diphtheria, tetanus, and whole-cell pertussis (DTwP) vaccines and to determine the possibility of implementing this method in Russia using standards and reagents manufactured in the country.

**Materials and methods.** The study used combined vaccines for diphtheria prophylaxis, diphtheria toxin, and reference vaccines. The potency of diphtheria and tetanus toxoids was determined in guinea pigs and mice by the pharmacopoeial lethal challenge method and an alternative ELISA method.

**Results.** ELISA and lethal challenge methods demonstrated comparable results of potency determination: 230 IU/mL vs 264 IU/mL (diphtheria toxoid), 188 IU/mL vs 160 IU/mL (tetanus toxoid), respectively. As opposed to the lethal challenge, the serological method allows testing the efficacy of several antigens in the same animals. The study showed the possibility of using purified diphtheria and tetanus toxoids manufactured in Russia as coating antigens. The authors obtained comparable antibody titres for each animal, using plates coated with international standards and Russian-made diphtheria and tetanus toxoids.

**Conclusions.** The authors demonstrated the possibility of using ELISA to determine the potency of diphtheria and tetanus toxoids in DTwP vaccines. Moreover, the study demonstrated the suitability of Russian purified diphtheria and tetanus toxoids as coating antigens. Researchers should continue working on enzyme immunoassay validation with a view to harmonising national and international methods for assessing the potency of diphtheria and tetanus toxoid vaccines, as these efforts will not only facilitate the registration of foreign vaccines in Russia but also accelerate the approval of Russian vaccines in other countries.

**Key words:** diphtheria and tetanus toxoids; alternative immunogenicity assay; enzyme immunoassay; serological enzyme immunoassay; ELISA; diphtheria vaccine; tetanus vaccine

**For citation:** Komarovskaya E.I., Soldatov A.A. Evaluation of the immune response to diphtheria and tetanus toxoids by the serological methods. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):321–332. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-321-332>

**Funding.** The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Введение

Дифтерия и столбняк представляют собой заболевания, клинические проявления которых связаны с действием токсинов, выделяемых бактериями *Corynebacterium diphtheriae* и *Clostridium tetani* соответственно. Иммуитет к обоим заболеваниям зависит главным образом от присутствия антитоксических антител класса IgG, способных связываться с токсином и нейтрализовать его. Иммунизация вакцинами против дифтерии и столбняка, стимулируя выработку протективных антител, нейтрализующих токсины, защищает от этих болезней. Это наиболее широко используемые во всем мире вакцины. Они получают путем химической инактивации соответствующих токсинов, в результате чего образуются дифтерийный анатоксин (ДА) и столбнячный анатоксин (СА). Данные вакцины – ключевые компоненты всех национальных программ иммунизации детей, также используются во всем мире для повышения ранее выработанного иммунитета у подростков и взрослых.

В состав многих комбинированных вакцин входят ДА и СА, которые также выпускаются в виде монопрепаратов. Чаще всего ДА (D) и СА (T) используют в сочетании с коклюшной вакциной, цельноклеточной (wP) или бесклеточной (aP). Современные комбинации также могут включать инактивированные полиомиелитные компоненты (IPV), а также компоненты вакцины против гепатита В (HepВ) и (или) *Haemophilus influenzae* типа b (Hib), они представлены на рынке в качестве тетра-, пента- или гексавалентных препаратов. К ним относится, например, DTwP-HepВ-Hib – Pentavac® (Serum Institute of India, Индия), DTaP-Hib-IPV – Пентаксим® (Sanofi Pasteur, Ltd, Франция).

В настоящее время в Европе лицензировано более 15 комбинаций вакцин, содержащих ДА и СА, различных производителей [1]. В Российской Федерации зарегистрировано 7 комбинированных вакцин отечественного производства, 4 – иностранных производителей<sup>1</sup>.

Оценка иммуногенности (эффективности) ДА и СА основана на методах *in vivo* – сравнение уровня защиты от летальных доз токсина, вызываемой у иммунизированных животных испытываемой вакциной, с уровнем защиты, которую вызывает введение референс-препарата (эталона), откалиброванного в международных единицах (МЕ).

Методы с введением летальных (ДА и СА) или парализующих (СА) доз токсинов приняты в качестве международного золотого стандарта и применялись на практике с 1950-х годов до настоящего времени. В то же время производители вакцин начали поиск альтернативных методов оценки иммуногенности. Развитие альтернативных серологических методов было продиктовано следованием принципам 3R (replacement, reduction, refinement – замена, сокращение, совершенствование), сформулированным в 1959 г. W.M.S. Russell и R.L. Burch. Данная концепция вызвала широкий интерес в научном сообществе и стимулировала разработку новых альтернативных методов. Развитие альтернативных серологических методов привело к тому, что они были включены в Руководство ВОЗ по контролю качества АКДС-вакцины<sup>2</sup>, Европейскую фармакопею (ЕФ)<sup>3</sup>, Японскую фармакопею<sup>4</sup>. Европейские производители вакцин применяют серологические методы в производственном процессе, они включены в нормативную документацию для контроля качества вакцин органами-регуляторами [2–5].

<sup>1</sup> <https://www.grls.rosminzdrav.ru>

<sup>2</sup> WHO/IVB/11.11. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

<sup>3</sup> Assay of diphtheria vaccine (adsorbed), general chapter 2.7.6 version 01/2008:20706. European Pharmacopoeia 10th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2019.

Assay of tetanus vaccine (adsorbed), general chapter 2.7.8 version 01/2008:20708. European Pharmacopoeia 10th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2019.

<sup>4</sup> Minimum requirements for biological products. National Institute of Infectious Diseases, Japan.

В настоящее время применяемые в мире методы определения иммуногенности могут быть разделены на две категории: *in vivo* – иммунизация животных с последующим введением токсина и определением защитного действия вакцин, *in vivo*, и *in vitro* – иммунизация животных с последующим определением уровня защитных антител в сыворотке крови, т.е. альтернативные серологические методы.

Оценку активности ДА и СА при помощи альтернативных серологических методов проводят путем сравнения гуморального ответа, индуцированного через 5–6 нед. у животных, иммунизированных тестируемой вакциной, и у животных, иммунизированных эталонным препаратом, откалиброванным в МЕ.

В международной практике существуют следующие серологические методы обнаружения антител, специфичных к дифтерийному и столбнячному анатоксинам.

#### **Метод иммуноферментного анализа для определения уровня антител к возбудителям дифтерии и столбняка**

Для определения титра антител 96-луночные планшеты высокой сорбции покрывают очищенным неадсорбированным дифтерийным (или столбнячным) анатоксином. Специфичные к возбудителям дифтерии (или столбняка) антитела, связанные с анатоксином, выявляют при помощи IgG морской свинки, конъюгированных с пероксидазой хрена с последующим добавлением подходящего субстрата – ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид) или АБТС (2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоислоты) диаммониевая соль). Измеряют оптическую плотность (optical density, OD) и рассчитывают титр антител для каждого отдельного образца сыворотки относительно положительного контроля, стандарт NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control – Национальный институт биологических стандартов и контроля, Великобритания).

В международных коллаборативных испытаниях показана возможность использования сыворотки крови одного животного для определения иммуногенности как ДА, так и СА; выявлено, что развитие окраски лунок прямо пропорционально концентрации дифтерийных и столбнячных антител в образце [6–8].

Важное преимущество этого метода состоит в том, что полученные сыворотки крови исполь-

зуют для определения активности как дифтерийного, так и столбнячного анатоксинов.

В настоящее время метод определения иммуногенности ДА и СА при помощи метода иммуноферментного анализа (ИФА) включен в Руководство ВОЗ<sup>5</sup>, ЕФ<sup>6</sup>.

#### **Определение уровня антител к возбудителю дифтерии клеточным методом (на культуре клеток Vero)**

Основой для разработки данного метода послужил токсин-нейтрализующий тест (ТНТ), утвержденный Национальным Институтом здоровья (National Institutes of Health, США) в 1947 г. для определения иммуногенности дифтерийного и столбнячного анатоксинов [9]. В 1957 г. К. Miyamura с соавт. впервые показал, что дифтерийный токсин подавляет рост клеточной культуры Vero. В 1970-х годах тест был преобразован в анализ на микропланшетах. Метод с использованием культивируемых клеток Vero (ТНТ *in vitro*) считается альтернативой теста ТНТ *in vivo*. Клетки Vero были идентифицированы как подходящая модель для специфического обнаружения защитных антител к дифтерии в сыворотке как человека, так и животных [10–12].

Тест отличается длительная подготовка клеточной линии для анализа: до достижения концентрации  $4 \times 10^5$  клеток/мл, а также определение минимальной цитопатической дозы дифтерийного токсина как наименьшей концентрации токсина (Lf/мл), которая способна вызвать цитопатические эффекты в клетках Vero после 6 сут инкубирования в культуре.

Для анализа нейтрализации токсина образцы сывороток помещают в планшет для тканевых культур, вносят дифтерийный токсин. Нейтрализованный токсин выявляют добавлением клеток Vero, погибающих в присутствии токсина, который не подвергся нейтрализации, в инкубационной смеси. Чем больше нейтрализующих антител присутствует в сыворотке, тем в большем числе разведений будет присутствовать положительный рост клеток. При помощи красителя (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ), способного по-разному окрашивать живые и мертвые клетки, определяют метаболическую активность клеток (МТТ-анализ). Измеряют OD, концентрацию исследуемых образцов сыворотки, рассчитывают относительно эталонного стандарта и выражают

<sup>5</sup> WHO/IVB/11.11. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

<sup>6</sup> Assay of diphtheria vaccine (adsorbed), general chapter 2.7.6 version 01/2008:20706. European Pharmacopoeia 10th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2019.

в МЕ/мл. Специфическую активность рассчитывают методом параллельных линий. Необходимо подчеркнуть, что чувствительность к дифтерийному токсину клеточной культуры различается для каждой серии, в связи с этим минимальную цитопатическую дозу необходимо определять для каждого исследования<sup>7</sup>.

В настоящее время метод определения иммуногенности ДА на культуре клеток Vero включен в Руководство ВОЗ<sup>8</sup>, ЕФ<sup>9</sup>.

#### **Определение уровня антител к дифтерийному анатоксину в реакции пассивной (непрямой) гемагглютинации**

Реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА) с 1950-х годов применяют для определения уровня антител в сыворотке крови иммунизированных животных и человека. Используют sensibilizированные дифтерийным анатоксином, предварительно формализированные и танизированные, эритроциты барана, индейки, лошади или человека, агглютинирующие впоследствии со специфическими антителами. Метод РПГА прост в выполнении и не требует специального лабораторного оснащения, легко воспроизводим и чувствителен, а также позволяет получить результаты уже через 1 ч. Анализ результатов некоторых исследований показывает высокую корреляцию РПГА с результатами теста ТНТ и методом летального заражения [13, 14]. В то же время в Руководстве по лабораторным методам ВОЗ<sup>10</sup> отмечено, что вопрос о степени корреляции между индивидуальными титрами антител, обнаруженными при помощи РПГА и методом ТНТ, остается дискуссионным. С другой стороны, РПГА надежен в тех случаях, когда необходимо сравнение уровня стимуляции иммунного ответа антител у животных, иммунизированных исследуемой вакциной и референс-вакциной, т.е. определение титра защитных антител не актуально. Вследствие этого в Руководстве по лабораторным методам ВОЗ РПГА рекомендовано рассматривать как вторичный метод для определения иммуногенности вакцин.

Следует отметить, что метод РПГА не стандартизирован. Национальные лаборатории каждой страны определяют вид животного, эритроциты которого применяют в методе, а также способы танизации и формализации. Метод внесен в Японскую фармакопею.

#### **Определение уровня антител к возбудителю столбняка методом ингибирования связывания токсина (ToBI)**

Метод ингибирования связывания токсина (Toxin-Binding Inhibition, ToBI) – модифицированный метод ИФА. Анализ состоит из двух этапов:

- 1) инкубация испытуемых сывороток и сывороток положительного и отрицательного контроля с известным количеством столбнячного токсина (или анатоксина);
- 2) определение несвязанного токсина (или анатоксина) методом ИФА.

Несвязанный токсин (или анатоксин) выявляют с помощью противостолбнячной сыворотки, нанесенной на лунки микропланшета. После удаления из лунок свободных реагентов оценивают количество токсина (или анатоксина), связавшегося с сывороткой путем последовательной инкубации со специфическим IgG морской свинки, конъюгированным с пероксидазой хрена, и последующей хромогенной реакции с субстратом ТМБ и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В результате реакции содержимое лунок окрашивается в желтый цвет, интенсивность которого измеряется при помощи соответствующего оборудования. Специфическую активность анализируемой вакцины рассчитывают путем интерполяции полученных результатов на кривую для стандартного образца и выражают в МЕ/мл.

В настоящее время метод включен в Руководство ВОЗ<sup>11</sup>, ЕФ<sup>12</sup>.

В России для определения иммуногенности вакцин против дифтерии и столбняка с 1960-х годов используют метод летального заражения<sup>13</sup> для вакцин со сниженным содержанием антигенов – метод анализа вы-

<sup>7</sup> WHO/IVB/11.11. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

<sup>8</sup> Там же.

<sup>9</sup> Assay of diphtheria vaccine (adsorbed), general chapter 2.7.6 version 01/2008:20706. European Pharmacopoeia 10th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2019.

<sup>10</sup> WHO/VSQ/97.04. Manual of laboratory methods for testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization. WHO; 1997.

<sup>11</sup> WHO/IVB/11.11. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

<sup>12</sup> Assay of diphtheria vaccine (adsorbed), general chapter 2.7.6 version 01/2008:20706. European Pharmacopoeia 10th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2019.

<sup>13</sup> ОФС.1.7.2.0003.15 Иммуногенность адсорбированного дифтерийного анатоксина. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

живаемости<sup>14</sup> [15], альтернативные методы для определения специфической активности вакцин для профилактики дифтерии и столбняка не разрабатывались.

В связи с активным развитием и применением в мире альтернативных методов контроля очевидна актуальность и необходимость установить возможность применения данных методов, в частности ИФА, для вакцин российского производства. Это позволит гармонизировать фармакопейные требования по подтверждению специфической активности вакцин отечественного производства с требованиями ведущих фармакопей мира, повысить конкурентоспособность российских вакцин.

#### **Определение иммуногенности вакцин иммунохимическим методом**

В расширенных международных исследованиях выявлено, что в серологическом тесте ИФА цельноклеточный коклюшный компонент комбинированных вакцин может влиять на результаты испытаний. Присутствие в таких вакцинах инактивированных полиомиелитных компонентов (IPV), компонентов вакцины против гепатита В и (или) антигена *H. influenzae* типа *b* также могут искажать результаты опыта [6–8].

Согласно рекомендациям ВОЗ<sup>15</sup> для внедрения в практику нового альтернативного метода следует подтвердить его эквивалентность тесту летального заражения с использованием вакцин отечественного производства.

Цель работы – оценить пригодность, воспроизводимость и возможность внедрения в отечественную практику альтернативного метода иммуноферментного анализа при определении иммуногенности дифтерийного и столбнячного компонентов комбинированных вакцин с цельноклеточным коклюшным компонентом; изучить возможность использования отечественных стандартных образцов и реактивов.

Для достижения указанной цели решались следующие задачи:

- установить возможность применения ИФА для определения специфической активности ДА и СА в вакцинах против дифтерии и столбняка, содержащих цельноклеточный коклюш-

ный компонент, а также возможность подтверждения критериям приемлемости;

- провести сравнительные испытания альтернативного метода ИФА относительно метода летального заражения (золотой стандарт);
- определить возможность замены международных образцов, применяемых в качестве реактивов, на российские аналоги.

## **Материалы и методы**

### **Лабораторные животные**

Использовались животные, выращенные в условиях конвенционального вивария (питомник «Андреевка», филиал ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России):

- морские свинки аутбредные (самцы и самки, вес от 250 до 300 г);
- мыши белые аутбредные (самки, вес от 18 до 20 г).

В период проведения исследования животных содержали в изолированном помещении конвенционального вивария при температуре +22–24 °С и относительной влажности воздуха не выше 60%, на стандартном рационе кормления, в условиях свободного доступа к корму и воде.

При проведении экспериментов соблюдали общепринятые этические нормы обращения с животными на основе стандартных операционных процедур, которые соответствуют основному международному регулируемому стандарту в области Надлежащей лабораторной практики (GCP) и Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях<sup>16</sup>.

### **Материалы**

- 1) Diphtheria Toxoid for use in Flocculation Test, 3rd WHO International Standard, 1870 Lf/ampoule (NIBSC code: 13/212). Возможно использование в качестве покрывающего антигена для определения специфической активности адсорбированного дифтерийного анатоксина в сыворотке крови морских свинок методом ИФА.
- 2) Tetanus Toxoid for use in Flocculation Test, 2nd WHO International Standard, 690 Lf/ampoule (NIBSC code: 04/150). Возможно использование в качестве покрывающего антигена для определения специфической активности адсорби-

<sup>14</sup> ФС.3.3.1.0003.15 Анатоксин дифтерийно-столбнячный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигенов (АДС-М-анатоксин). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

<sup>15</sup> Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

<sup>16</sup> ГОСТ 33044–2014. Принципы надлежащей лабораторной практики. ETS No. 123. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg; 1986.

ETS No. 170. Protocol of amendment to the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg; 1998.

рованного столбнячного анатоксина в сыворотке крови морских свинок методом ИФА.

- 3) Guinea Pig Serum, Diphtheria and Tetanus Antitoxin, Non-WHO Reference Material (NIBSC code: 98/572) – сыворотка морских свинок, иммунизированных адсорбированным дифтерийным и столбнячным анатоксинами, смешанными в соотношении 1:1. Содержит специфические антитела к возбудителям дифтерии и столбняка. Применяется в качестве положительного контроля для определения специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов в сыворотке крови морских свинок методом ИФА. Каждая ампула содержит 3,1 МЕ дифтерийного антитоксина и 3,5 МЕ столбнячного антитоксина.
- 4) Guinea Pig Serum, Non-WHO Reference Material (NIBSC code: 98/686) – нативная сыворотка крови морских свинок Dunkin-Hartley (Великобритания). Материал может быть использован как негативный контроль в исследованиях по определению иммунного ответа на вакцинацию дифтерийной и столбнячной вакцинами.
- 5) Отраслевой стандартный образец активности адсорбированного дифтерийного анатоксина, ОСО 42-28-250. Специфическая (иммуногенная) активность 330 МЕ/ампула.
- 6) Отраслевой стандартный образец активности адсорбированного столбнячного анатоксина, ОСО 42-28-247. Специфическая (иммуногенная) активность 180 МЕ/ампула.
- 7) Анатоксин дифтерийный очищенный концентрированный жидкий (ОКДА), АО «НПО «Микроген», Россия.
- 8) Анатоксин столбнячный очищенный концентрированный жидкий (ОКСА), АО «НПО «Микроген», Россия.
- 9) Референс-вакцина, стандарт Sanofi Pasteur, Ltd (Франция), серия ADA15G.
- 10) Конъюгат козьего иммуноглобулина с пероксидазой хрена с антителами к IgG морской свинки (Sigma, кат. № A7289).

### Методы

Метод летального заражения применяли в соответствии с фармакопейной статьей (ФС) «Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная ад-

сорбированная», метод с одним разведением и метод с тремя разведениями<sup>17</sup>.

Метод ИФА использовался в соответствии с Руководством по контролю качества вакцин против дифтерии, столбняка, коклюша (ВОЗ)<sup>18</sup>.

Животных иммунизировали, подвергали однократному или многократному анализу (в соответствии с ФС.3.3.1.0010.15<sup>19</sup>). Через 6 нед. путем кардиальной пункции проводили забор крови в объеме от 1,5 до 2,5 мл, отделяли сыворотку.

*Забор крови методом кардиальной пункции.* Животное фиксировали в положении на спине при помощи ассистента. Используя шприц (объем – 5 мл, игла 21G 1,5" (0,8×40 мм), проводили прокол грудной стенки в VI межреберье (локализацию уточняли вручную – как место с самым сильным сердцебиением). Иглу вводили в грудную полость приблизительно на одну треть. Кровь из шприца переливали в предварительно промаркированную пробирку, содержащую гель с активатором свертывания. Для каждого животного использовали отдельный шприц.

#### *Получение сыворотки крови*

- 1) Инкубирование пробирок с кровью: в течение 2 ч при +37 °С; далее еще в течение 2 ч при +4 °С.
- 2) Центрифугирование пробирок в течение 20 мин при 2000 rpm (в случае обнаружения в сыворотке клеток крови проводили повторное центрифугирование).
- 3) Инкубирование на водяной бане (+56 °С, 30 мин) сыворотки, перенесенной из центрифуги при помощи пипетки в чистую пробирку. Сыворотку, полученную от каждого животного, разделяли на аликвоты. Если анализ проводили в течение 2 сут после получения сыворотки, пробы хранили при +4 °С, затем их помещали на хранение при –20 °С.

### **Определение специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов методом ИФА**

Для определения титра антител 96-луночные планшеты (NUNC® MaxiSorp®) покрывали (100 мкл на лунку) неадсорбированным ДА (NIBSC 13/212 или ОКДА), разведенным до концентрации 0,5 Lf/мл, или неадсорбированным СА (NIBSC 04/150 или ОКСА), разведенным до концентрации 0,5 Lf/мл, в карбонат-бикарбонат-

<sup>17</sup> ФС.3.3.1.0003.15 Анатоксин дифтерийно-столбнячный адсорбированный с уменьшенным содержанием антигенов (АДС-М-анатоксин). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

<sup>18</sup> WHO/IVB/11.11. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

<sup>19</sup> ФС.3.3.1.0010.15 Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная (АКДС-вакцина). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

<sup>20</sup> WHO/IVB/11.11. Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines. WHO; 2013.

ном буфере (рН=9,6). Планшеты инкубировали в течение (20±4) ч при +4 °С, затем промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащим 0,05% Tween 20 и 0,1% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА). После цикла промывки (300 мкл×3) в каждую лунку вносили 250 мкл блокирующего буферного раствора (0,1 % БСА), инкубировали при +37 °С в течение 1 ч. После второй промывки в лунки рядов В–Н вносили ФСБ по 100 мкл на лунку, затем в ряд А вносили по 200 мкл на лунку контрольные сыворотки и тестируемые образцы (разведение 1:200) согласно схеме (табл. 1), делали серию двукратных разведений.

Планшеты инкубировали при +37 °С в течение 1 ч. После цикла промывки в каждую лунку вносили антигенспецифические IgG-антитела морской свинки, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, кат. № А7289) (100 мкл/

вали при комнатной температуре, затем следовал цикл промывки. Вносили раствор хромогена (ТМБ), реакции давали развиваться в течение 30 мин. Останавливали реакцию внесением 1 М раствора серной кислоты (50 мкл на лунку). Оптическую плотность исследуемого раствора измеряли при длине волны 450 нм (длина волны сравнения – 540 нм). Преобразование данных OD (путем вычитания среднего значения OD холостой пробы) проводили в программе Microsoft Excel, расчет специфической активности – методом параллельных линий с использованием программного обеспечения in-house на платформе SAS® University Edition Software (Sanofi Pasteur, Канада). Данный программный продукт представляет стандартную кривую (4PL) с ассоциированным наклоном и коэффициентом корреляции (R<sup>2</sup>); среднеквадратичное отклонение (SD), коэффициент вариации CV (%).

**Таблица 1.** Схема внесения стандартных и испытуемых образцов для определения специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов методом ИФА (составлена авторами по данным Руководства по контролю качества вакцин против дифтерии, столбняка и коклюша ВОЗ<sup>20</sup>)

**Table 1.** Plate layout of test and reference serum samples for assessing the potency of diphtheria and tetanus toxoids by enzyme immunoassay (prepared by the authors using the WHO Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines<sup>20</sup>)

Ряд планшета <i>Column</i>	Проба <i>Sample</i>											
	ХП <i>B</i>	ИС 1 <i>TS 1</i>	ИС 2 <i>TS 2</i>	ПК <i>PSC</i>	ИС 3 <i>TS 3</i>	ИС 4 <i>TS 4</i>	ИС 5 <i>TS 5</i>	ПК <i>PSC</i>	ОК <i>NSC</i>	ИС 6 <i>TS 6</i>	ИС 7 <i>TS 7</i>	ИС 8 <i>TS 8</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ХП <i>B</i>	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*	1/1*
B	ХП <i>B</i>	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
C	ХП <i>B</i>	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
D	ХП <i>B</i>	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8
E	ХП <i>B</i>	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16
F	ХП <i>B</i>	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32
G	ХП <i>B</i>	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64
H	ХП <i>B</i>	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

**Примечание.** ИФА – иммуноферментный анализ; ХП – холостая проба; ИС – исследуемая сыворотка; ПК – положительный контроль; ОК – отрицательный контроль; 1–12 – номер лунки ряда микропланшета. \* Фактор разведения.

**Note.** B, blank control; TS, test serum; PSC, positive serum control; NSC, negative serum control. Numbers 1–12 indicate plate wells. \* Dilution ratio.

лунка), разведенные в 1:2000 в ФСБ. Инкубиро-

В случае многодозового анализа программа проводит расчет концентраций определяемого компонента в каждом разведении (МЕ/мл) положительного контроля и испытуемых образцов, определяет среднее геометрическое значение, среднее квадратическое отклонение, доверительный интервал, коэффициент корреляции, критерий Бартлетта, хи-квадрат. Если вакцину исследуют методом однодозового анализа, программа демонстрирует, что содержание анатоксина достоверно выше минимально требуемого.

Достоверность результатов, полученных методом ИФА, оценивали в соответствии со следующими критериями:

- $R^2$  стандартной кривой не менее 0,95;
- в случае положительной контрольной сыворотки морской свинки должна регистрироваться кривая «доза – ответ» с линейным диапазоном, охватывающим не менее 3 точек;
- в случае отрицательного контрольного образца не должен регистрироваться положительный ответ;
- среднее значение OD холостой пробы не более 0,100.

### Результаты и обсуждение

Поскольку существует потенциальная возможность влияния цельноклеточного коклюшного компонента на результат ИФА, для анализа степени влияния проведена следующая серия опытов. Животных иммунизировали АКДС-вакциной (Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная), АДС-М-анатоксином (Анатоксин дифтерийно-столбнячный очищенный, адсорбированный, с уменьшенным содержанием антигенов, жидкий), а также Адасель (Вакцина для профилактики дифтерии (с уменьшенным содержанием антигена), коклюша (с уменьшенным содержанием антигена, бесклеточная) и столбняка, комбинированная, адсорбированная). Адасель использовали в качестве контроля как вакцину, исключая влияние цельноклеточного коклюшного компонента; АДС-анатоксин применяли в таком же качестве, но со сниженным содержанием антигенов.

На первом этапе исследования выполнена серия опытов по определению активности СА и ДА методом однодозового анализа. Животных иммунизировали эквивалентными дозами (2 МЕ/мл) соответствующей вакцины. Через 6 нед. получали сыворотку крови животных, помещали образцы сывороток на один микропланшет для сравнения значений оптической плотности. Данные величины OD преобразовывали в программе Microsoft Excel: коррекция значений OD, построение кривой стандартного

образца (зависимость OD от логарифма концентрации). По результатам опытов установлено, что значения титров антител к дифтерийному и столбнячному анатоксинам у животных, иммунизированных вакциной сравнения и тестируемыми вакцинами, сопоставимы.

Правильность выполнения подтверждена критериями приемлемости, программным обеспечением in-house на платформе SAS® University Edition Software (Sanofi Pasteur, Канада) и CombiStats® (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, EDQM). Однодозовый анализ не ставит задачу определить количественное содержание анатоксинов в препарате, а показывает, что содержание анатоксина достоверно выше минимально требуемого. По результатам представленных опытов содержание СА и ДА в исследуемых вакцинах достоверно выше, чем в вакцине сравнения. Достоверность различия между исследуемой вакциной и вакциной сравнения по результатам шести опытов:  $p < 0,05$ . Исходя из этого можно заключить, что цельноклеточный коклюшный компонент не оказывает влияния на результаты реакции ИФА при определении титров специфических антител к дифтерийному и столбнячному анатоксинам в сыворотках морских свинок.

Следующий этап исследования – проведение сравнительных испытаний метода ИФА относительно летального заражения (золотой стандарт) методом многодозового анализа. Работу проводили на одних и тех же особях в соответствии с протоколом ранее проведенных коллаборативных испытаний по валидации серологических методов под эгидой EDQM [5–10]: морские свинки были разделены на шесть групп по 10 особей в каждой. Три группы иммунизировали референс-вакциной, разведенной до 4, 2, 1 МЕ/мл, и три группы – испытуемой АКДС-вакциной, разведенной аналогично. Для контроля токсина сформировали три группы, в каждой по пять неиммунизированных морских свинок. Животным подкожно вводили по 1,0 мл соответствующих разведений вакцин. Морские свинки после иммунизации находились под наблюдением 42 сут (6 нед.) вместо 28 сут (4 нед.). На 42-е сутки у животных проводили забор крови (сердечная пункция), получали сыворотку. Через 2 сут после забора крови морским свинкам делали инъекции провокационного дифтерийного токсина, регистрировали количество выживших животных в каждой группе в течение 4 сут. Для подтверждения правильности выбранной дозы контрольного токсина неиммунизированным морским свинкам вводили три дифференцированные дозы токсина

(2, 1, 0,5  $Ld_{50}$ /мл). Результаты, полученные методом летального заражения, для ДА рассчитывали по формуле Кербера. Для определения содержания СА методом летального заражения этой же серии вакцины испытание проводили согласно ФС.3.3.1.0010.15<sup>21</sup>.

Сыворотки исследовали методом ИФА. Полученные значения OD преобразовывали с использованием программы Microsoft Excel, как описано выше, затем обрабатывали при помощи программного обеспечения in-house на платформе SAS® University Edition Software (Sanofi Pasteur, Канада).

Определение специфической активности ДА и СА в составе вакцин, содержащих цельноклеточный коклюшный компонент, продемонстрировало сопоставимые результаты, полученные методами ИФА и летального заражения:

- специфическая активность дифтерийного компонента вакцины АКДС, определенная методом ИФА, составила 230 МЕ/мл, методом летального заражения – 264 МЕ/мл. Нормативные требования к содержанию дифтерийного анатоксина – не менее 60 МЕ/мл;
- специфическая активность столбнячного компонента вакцины АКДС, определенная мето-

дом ИФА, составила 188 МЕ/мл, методом летального заражения (на мышах) – 160 МЕ/мл. Нормативные требования к содержанию столбнячного анатоксина – не менее 120 МЕ/мл.

Следующие эксперименты были посвящены определению возможности замены международных образцов, применяемых в качестве покрывающих антигенов, на российские аналоги. В качестве покрывающего антигена, согласно методике ВОЗ<sup>22</sup>, используют международные стандарты неадсорбированных дифтерийного (NIBSC 13/212) и столбнячного (NIBSC 04/150) анатоксинов для реакции флокуляции. В Российской Федерации подобные стандартные образцы отсутствуют. Вместе с тем следует учесть, что при производстве АКДС-вакцины получают субстанции, которые представляют собой очищенные концентрированные неадсорбированные анатоксины (дифтерийный и столбнячный) с установленной концентрацией. В следующих опытах мы определяли возможность использования в качестве покрывающих антигенов ОКДА и ОКСА вместо соответствующих международных стандартных образцов. В проведенной серии тестов использовались сыворотки животных, полученные в предыдущих опытах. Раз-

**Таблица 2.** Сравнение значений титров антител в сыворотке крови иммунизированных АКДС-вакциной морских свинок для определения IgG, специфичных к дифтерийному и столбнячному анатоксинам, с использованием различных покрывающих антигенов

**Table 2.** Comparison of measurements of diphtheria-specific and tetanus-specific IgG titres in the sera of DTwP-immunised guinea pigs using plates coated with different toxoids

Покрывающий антиген <i>Coating antigen</i>	Образцы сыворотки <i>Serum samples</i>											
	ИС 1 <i>TS 1</i>	ИС 2 <i>TS 2</i>	ИС 3 <i>TS 3</i>	ИС 4 <i>TS 4</i>	t+	ИС 5 <i>TS 5</i>	ИС 6 <i>TS 6</i>	t+	t–	ИС 7 <i>TS 7</i>	ИС 8 <i>TS 8</i>	ИС 9 <i>TS 9</i>
Неадсорбированный дифтерийный анатоксин (NIBSC 13/212) <i>Purified diphtheria toxoid (NIBSC 13/212)</i>	2,73	1,42	1,56	1,83	2,99	1,64	1,42	2,79	0,6	2,61	1,64	1,26
ОКДА (Россия) <i>Purified diphtheria toxoid (Russia)</i>	4,81	3,02	2,18	2,71	3,00	3,33	2,14	2,99	0,9	3,33	2,14	1,59
Неадсорбированный столбнячный анатоксин NIBSC 04/150 <i>Purified tetanus toxoid (NIBSC 04/150)</i>	3,20	2,32	1,93	4,2	3,00	4,27	3,30	3,2	1,0	6,79	4,74	2,99
ОКСА (Россия) <i>Purified tetanus toxoid (Russia)</i>	2,93	2,21	1,84	6,2	3,10	4,20	3,88	4,05	1,3	9,56	5,39	2,97

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

*Примечание.* АКДС-вакцина – вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная, цельноклеточная; ИС – исследуемая сыворотка; t+ – сыворотка морских свинок NIBSC 98/572 (положительный контроль); t– – нативная сыворотка морских свинок NIBSC 68/686 (отрицательный контроль), ОКДА – анатоксин дифтерийный очищенный концентрированный жидкий, ОКСА – анатоксин столбнячный очищенный концентрированный жидкий.

*Note.* DTwP, adsorbed diphtheria, tetanus, and whole-cell pertussis vaccine; TS, test serum; t+, Guinea Pig Serum NIBSC 98/572 (positive control); t–, Guinea Pig Serum NIBSC 98/686 (negative control).

<sup>21</sup> ФС.3.3.1.0010.15 Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

<sup>22</sup> WHO/IVB/11.11. Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

водили ОКДА и ОКСА до концентрации 0,5 Lf/мл. Параллельно те же образцы сывороток исследовали на микропланшетах, покрытых стандартами NIBSC. Получены сопоставимые значения OD (табл. 2) и титров антител каждого животного, что подтвердило потенциальную возможность использовать ОКДА и ОКСА в качестве покрывающих антигенов.

В ходе исследований были определены критические точки методики ИФА: режим инкубации; условия перемешивания при разведении сывороток в лунках микропланшета; срок использования и хранения исследуемых сывороток, не подвергшихся замораживанию; срок хранения планшетов, покрытых антигеном и др.

### Заключение

Проведенные исследования комбинированных вакцин отечественного производства позволяют сделать вывод о том, что оцен-

ка специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов в вакцинах против дифтерии и столбняка, содержащих цельноклеточный коклюшный компонент, при помощи метода иммуоферментного анализа возможна. Результаты сравнительного исследования оценки специфической активности методом летального заражения и методом иммуоферментного анализа оказались сопоставимы.

Установлено, что в качестве покрывающего антигена возможно применение неадсорбированных дифтерийного и столбнячного анатоксинов российского производства, что позволяет снизить стоимость анализа и зависимость от поставок из-за рубежа.

Необходимо продолжить работу по валидации методики, а также уточнить оптимальные рабочие концентрации неадсорбированных дифтерийного и столбнячного анатоксинов в качестве покрывающих антигенов.

### Литература/References

- Stickings P, Rigsby P, Coombes L, Hockley J, Tierney R, Sesardic D. Animal refinement and reduction: alternative approaches for potency testing of diphtheria and tetanus vaccines. *Procedia Vaccinol.* 2011;5:200–12. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2011.10.020>
- Akkermans A, Chapsal JM, Coccia EM, Depraetere H, Dierick JF, Duangkhae P, et al. Animal testing for vaccines. Implementing replacement, reduction and refinement: challenges and priorities. *Biologicals.* 2020;68:92–107. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2020.07.010>
- Stalpers CAL, Retmana IA, Pennings JLA, Vandebriel RJ, Hendriksen CFM, Akkermans AM, Hoefnagel MHN. Variability of *in vivo* potency tests of Diphtheria, Tetanus and acellular Pertussis (DTaP) vaccines. *Vaccine.* 2021;39(18):2506–16. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.078>
- Moreira WC, de Souza Machado N, de Souza Freitas JF, de Almeida AECC, de Moura WC. Alternative potency tests for quality control of immunobiologicals: a critical review of the validation approach. *Vigil Sanit Debate.* 2020;8(1):48–61. <https://doi.org/10.22239/2317-269X.01259>
- Lilley E, Isbrucker R, Ragan I, Holmes A. Integrating 3Rs approaches in WHO guidelines for the batch re-release testing of biologicals. *Biologicals.* 2021;74:24–7. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2021.10.002>
- Winsnes R, Sesardic D, Daas A, Behr-Gross ME. Collaborative study for the validation of serological methods for potency testing of diphtheria toxoid vaccine (part 2). *Pharmeuropa Bio.* 2006;2006(1):73–88. PMID: 17270133
- van Ramshorst JD, Sundaresan TK, Outschoorn AS. International collaborative studies on potency assays of diphtheria and tetanus toxoids. *Bull World Health Organ.* 1972;46(2):263–76. PMID: 4537488
- Tierney R, Hockley J, Rigsby P, Sesardic D. WHO/BS/10.2150. *International collaborative study: calibration of replacement WHO international standard for tetanus toxoid adsorbed.* World Health Organization; 2010.
- Keller JE. Overview of currently approved serological methods with a focus on diphtheria and tetanus toxoid potency testing. *Procedia Vaccinol.* 2011;5:192–9. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2011.10.019>
- Dular U. Comparative studies of the *in vivo* toxin neutralization and the *in vitro* Vero cell assay methods for use in potency testing of diphtheria component in combined vaccines/toxoids.: 1: Standardization of a modified Vero cell assay for toxin-antitoxin titration of immunized guinea-pig sera. *Biologicals.* 1993;21(1):53–9. <https://doi.org/10.1006/biol.1993.1046>
- Miyamura K, Nishio S, Ito A, Murata R, Kono R. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using Vero cells. I. Studies on factors affecting the toxin and antitoxin titration. *J Biol Stand.* 1974;2(3):189–201. [https://doi.org/10.1016/0092-1157\(74\)90015-8](https://doi.org/10.1016/0092-1157(74)90015-8)
- Miyamura K, Tajiri E, Ito A, Murata R, Kono R. Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using Vero cells. II. Comparison with the rabbit skin method and practical application for seroepidemiological studies. *J Biol Stand.* 1974;2(3):203–9. [https://doi.org/10.1016/0092-1157\(74\)90016-x](https://doi.org/10.1016/0092-1157(74)90016-x)
- Maheshwari SC, Sharma SB, Ahuja S, Saxena SN. The reduction of animal usage by the application of indirect haemagglutination in the potency testing of diphtheria toxoid in combined vaccines. *J Biol Stand.* 1988;16(1):9–14. [https://doi.org/10.1016/0092-1157\(88\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0092-1157(88)90024-8)

14. Комаровская ЕИ, Перельгина ОВ. Современное состояние методов оценки безопасности и эффективности дифтерийного и столбнячного компонентов комбинированных вакцин. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2022;21(3):96–106.

Komarovskaya EI, Perelygina 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>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.И. Комаровская** — анализ, систематизация и обобщение данных научной литературы и нормативной документации, планирование исследования, выполнение экспериментальной части, интерпретация результатов исследования, написание и редактирование текста рукописи, работа с графическим материалом; **А.А. Солдатов** — критический пересмотр и редактирование текста рукописи.

**Соответствие принципам этики.** Исследования выполнены в соответствии с принципами, изложенными в основном регулирующем межгосударственном стандарте в области Надлежащей лабораторной практики (GCP) и Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях.

**Благодарности.** Авторы благодарят А.И. Куряшову, Е.В. Вавилину, инженеров-лаборантов лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, за помощь в выполнении экспериментальной части работы. В планировании экспериментальной части и подведении итогов работы принимала активное участие О.В. Перельгина (1946–2023), канд. мед. наук, начальник лаборатории анатоксинов и антитоксических препаратов Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.I. Komarovskaya** analysed, collated, and consolidated literature data and regulatory requirements; designed the study; conducted experiments; interpreted the study results; drafted and edited the manuscript; and worked with illustrative material. **A.A. Soldatov** critically revised and edited the manuscript.

**Ethics approval.** All the experiments were performed according to the principles set forth in the interstate standard on Good Laboratory Practice (GOST 33647-2015) and the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Experiments and Other Scientific Purposes.

**Acknowledgements.** The authors express their gratitude to A.I. Kuryashova and E.V. Vavilova, laboratory technicians of the Laboratory of Anatoxins and Antitoxin Products, Testing Centre for Biological Medicinal Products Quality Control, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, for their help with carrying out the experiments. O.V. Perelygina (1946–2023), Doctor of Sciences, Head of the Laboratory of Anatoxins and Antitoxin Products of the Testing Centre for Biological Medicinal Products Quality Control of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, took an active part in planning the experimental part and summing up the results of the work.

## Об авторах/Authors

**Комаровская Елена Игоревна**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9035-6072>

[komarovskaya@expmed.ru](mailto:komarovskaya@expmed.ru)

**Солдатов Александр Алексеевич**, д-р мед. наук

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6624-2692>

[soldatov@expmed.ru](mailto:soldatov@expmed.ru)

Поступила 22.07.2022

После доработки 18.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

**Elena I. Komarovskaya**

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9035-6072>

[komarovskaya@expmed.ru](mailto:komarovskaya@expmed.ru)

**Aleksandr A. Soldatov**, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6624-2692>

[soldatov@expmed.ru](mailto:soldatov@expmed.ru)

Received 22 July 2023

Revised 18 August 2023

Accepted 13 September 2023