

УДК 615.371

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-333-347>

Научная статья | Scientific article



## Влияние коклюшного токсина и липоолигосахарида *Bordetella pertussis* на специфическую токсичность и защитную активность цельноклеточной коклюшной вакцины

И.А. Алексеева<sup>✉</sup>, И.В. Ибрагимхалилова, Д.Н. Лепихова

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

✉ Алексеева Ирина Андреевна; [Alekseeval@expmed.ru](mailto:Alekseeval@expmed.ru)

### Резюме

**Актуальность.** Главными факторами, определяющими реактогенность коклюшной цельноклеточной вакцины, принято считать содержание липоолигосахарида *Bordetella pertussis* и остаточное содержание активного коклюшного токсина. Изучение токсического воздействия коклюшных компонентов бактериальной клетки *B. pertussis* на основные показатели качества цельноклеточной коклюшной вакцины (защитную активность и специфическую токсичность – термины, принятые в рекомендациях ВОЗ и Европейской фармакопее) актуально и необходимо для повышения качества препарата.

**Цель.** Изучение токсического влияния липоолигосахарида *B. pertussis* и остаточного количества активного коклюшного токсина, присутствующих в цельноклеточной адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцине, на специфическую токсичность и защитную активность препарата.

**Материалы и методы.** Исследовали 57 коммерческих серий адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцины на соответствие показателей качества требованиям нормативной документации. К группе 1 отнесли серии, не выдержавшие испытания по показателю «Специфическая токсичность»; к группе 2 – соответствующие требованиям. Защитную активность определяли в тесте экспериментального менингоэнцефалита на мышах линии F1 CBA×C57Bl/6j, иммунизированных АКДС- и референс-вакцинами. Специфическую токсичность препарата определяли в тесте изменения массы тела мышей после внутрибрюшинного введения вакцины АКДС. Токсическое действие липоолигосахарида оценивали опосредованно – через изменение массы тела мышей в первые 16–24 ч; коклюшного токсина – на 7-е сутки. Корреляционный анализ тесноты связи между установленными показателями токсического действия исследуемых компонентов и показателями специфической токсичности и защитной активности, полученными в этих же сериях вакцины, проводили при помощи коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

**Результаты.** Опосредованно определили токсическое действие липоолигосахарида и остаточного количества активного коклюшного токсина в исследуемых сериях. Коэффициенты корреляции между показателями специфической токсичности и защитной активности вакцины (группа 2) и показателями токсического действия липоолигосахарида составили 0,113 ( $p>0,05$ ) и 0,049 ( $p>0,05$ ) соответственно, для коклюшного токсина – 0,595 ( $p<0,01$ ) и –0,534 ( $p<0,01$ ) соответственно.

**Выводы.** Выявлено и оценено токсическое действие липоолигосахарида *B. pertussis* и остаточного количества активного коклюшного токсина в цельноклеточной вакцине; установлена обратная корреляционная связь между защитной активностью вакцины и токсическим действием остаточного уровня активного коклюшного токсина. Тесты продемонстрировали, что показатель, оценивающий специфическую токсичность цельноклеточной

коклюшной вакцины, не отражает присутствие и содержание липоолигосахарида в вакцине. Опираясь на результаты исследования, можно утверждать, что в производственных коклюшных штаммах, используемых для изготовления цельноклеточной коклюшной вакцины, целесообразно определять содержание липоолигосахарида *B. pertussis*, что в Российской Федерации в настоящее время не принято.

**Ключевые слова:** цельноклеточная коклюшная вакцина; ЦКВ; защитная активность и специфическая токсичность вакцины; реактогенность вакцины; токсическое действие коклюшного компонента; липоолигосахарид *Bordetella pertussis*; коклюшный токсин

**Для цитирования:** Алексеева И.А., Ибрагимхалилова И.В., Лепихова Д.Н. Влияние коклюшного токсина и липоолигосахарида *Bordetella pertussis* на специфическую токсичность и защитную активность цельноклеточной коклюшной вакцины. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3):333–347. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-333-347>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» 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.

## Effects of pertussis toxin and *Bordetella pertussis* lipo-oligosaccharide on the specific toxicity and potency of whole-cell pertussis vaccines

Irina A. Alekseeva ✉, Ilkhamya V. Ibragimkhalilova, Darya N. Lepikhova

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

✉ Irina A. Alekseeva; [Alekseeval@expmed.ru](mailto:Alekseeval@expmed.ru)

### Abstract

**Scientific relevance.** The content of *Bordetella pertussis* lipo-oligosaccharide (LOS) and the residual levels of active pertussis toxin (PT) are generally accepted to be the primary factors that determine the reactogenicity of whole-cell pertussis vaccines. To improve the quality of whole-cell pertussis vaccines, it is both relevant and necessary to study the relationship between the toxicity of *B. pertussis* bacterial cell components and the main quality parameters of these vaccines, including their potency and specific toxicity, as termed in the WHO recommendations and the European Pharmacopoeia.

**Aim.** This study aimed to analyse the effects of *B. pertussis* LOS and residual active PT on the specific toxicity and potency of adsorbed diphtheria, tetanus, and whole-cell pertussis (DTwP) vaccines.

**Materials and methods.** The authors tested 57 commercial batches of adsorbed DTwP vaccines for compliance with the regulatory standards and product specification files. Vaccine batches that failed specific toxicity tests formed Group 1, and the other batches were designated as Group 2. The potency was tested in F1 hybrid mice (CBA/Ca×C57BL/6J) with experimentally induced meningoencephalitis that were immunised with DTwP and reference vaccines. The authors assessed the specific toxicity of DTwP vaccines by changes in body weight following intraperitoneal administration. The toxic activity was assessed indirectly by changes in body weight in the first 16–24 h (*B. pertussis* LOS) and on day 7 (PT) after dosing. The authors used Spearman's rank correlation coefficient to measure the strength of correlation between the toxic activity of vaccine components and the specific toxicity and potency of the vaccine, which were established using the same vaccine batches.

**Results.** The authors measured the toxic activity of LOS and residual active PT in the vaccine batches studied. The correlation coefficients between the specific toxicity and potency of the vaccines (Group 2) and the toxic activity of LOS were 0.113 ( $p>0.05$ ) and 0.049 ( $p>0.05$ ), respectively.

Similarly, the correlation coefficients between the specific toxicity and potency of the vaccines and the toxic activity of PT accounted for 0.595 ( $p < 0.01$ ) and  $-0.534$  ( $p < 0.01$ ), respectively.

**Conclusions.** The authors studied the toxic activity of *B. pertussis* LOS and residual active PT in whole-cell pertussis vaccines and found an inverse correlation between the potency of the vaccines and the toxic activity of residual active PT. The study demonstrated that the specific toxicity test for whole-cell pertussis vaccines fails to detect and quantify *B. pertussis* LOS in the samples. The authors advise to determine the content of LOS in the *B. pertussis* strains intended for the production of whole-cell pertussis vaccines, which is not yet an accepted practice in the Russian Federation.

**Key words:** whole-cell pertussis vaccine; wP vaccine; potency; specific toxicity; vaccine reactogenicity; pertussis component toxic activity; *Bordetella pertussis* lipo-oligosaccharide; pertussis toxin

**For citation:** Alekseeva I.A., Ibragimkhalilova I.V., Lepikhova D.N. Effects of pertussis toxin and *Bordetella pertussis* lipo-oligosaccharide on the specific toxicity and potency of whole-cell pertussis vaccines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):333–347. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-333-347>

**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

*Bordetella pertussis* – патоген, способный развиваться исключительно в организме человека и вызывать развитие коклюша, высококонтагиозного заболевания дыхательных путей, которое особенно опасно для детей раннего возраста. В современном мире коклюш – серьезная проблема здравоохранения, поскольку служит одной из основных причин смертности среди младенцев [1]<sup>1</sup>.

Для борьбы с коклюшем с 1940-х годов в качестве самостоятельного препарата использовали коклюшную цельноклеточную вакцину (ЦКВ), которая в качестве коклюшного компонента с 1960-х годов была введена в состав адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной (АКДС) вакцины.

Широкое использование коклюшной ЦКВ продемонстрировало ее профилактическую эффективность: снижение заболеваемости коклюшем с 400–600 случаев на 100 тыс. населения до спорадических значений [2]<sup>2</sup>. В то же время следует учитывать отрицательную черту ЦКВ – ее реактогенность [3, 4]. В 1990–2000-е годы развитые западные страны в связи с чрезмерными опасениями по поводу ожидаемых поствакцинальных осложнений отказались от применения коклюшной ЦКВ<sup>3</sup>. Как альтернативу стали применять коклюшную бесклеточную вакцину

(БКВ), в состав которой входит от одного до пяти антигенов: коклюшный анатоксин, филаментозный гемагглютинин, пертактин, фимбриальные агглютиногены 2 и 3 [5, 6].

Постмаркетинговые исследования не подтвердили взаимосвязь между вакцинацией и негативными реакциями организма, такими как повреждение головного мозга, неврологические расстройства, появление или развитие энцефалопатии (ранее подобные проявления приписывались воздействию коклюшной ЦКВ) [7].

Определенные опасения, связанные с возможными поствакцинальными нежелательными явлениями, привели к использованию в развитых странах альтернативной БКВ. Однако во многих странах продолжают производить и широко применять ЦКВ [8]. При сравнительном наблюдении за коклюшными БКВ и ЦКВ отмечено, что в отношении тяжелых поствакцинальных реакций обе вакцины, по-видимому, характеризуются приемлемой токсичностью. Легкие и умеренные поствакцинальные реакции, как установлено, чаще происходят после введения ЦКВ. Разнообразные комбинации БКВ по сравнению с ЦКВ обладают меньшей реактогенностью, но значительно уступают ей в эффективности [9–11].

В настоящее время в профилактической медицине сложилась непростая ситуация. Используются два типа коклюшных вакцин – эффективная

<sup>1</sup> WHO Technical Report Series No. 941. Annex 6. Recommendations for whole-cell pertussis vaccine. WHO; 2007.

<sup>2</sup> <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6239md.htm>

<sup>3</sup> Prevention and care of illness. Neonates and infants newborn health and survival. A call to action. Geneva: World Health Organization; 2004.

ЦКВ с более высокой реактогенностью, что снижает возможность ее повсеместного применения, и слабо реактогенная БКВ с ограниченной иммуногенной активностью. Показано, что пять прививочных доз коклюшной БКВ не могут сформировать такую же пролонгированную защиту от коклюшной инфекции, которую индуцирует одна доза коклюшной ЦКВ [10]. Вследствие этого в Австралии, развитых странах Европы и Северной Америки, где применяют коклюшную БКВ, наблюдается выраженная тенденция к росту заболеваемости коклюшем, сопровождающаяся эпидемическими вспышками. В научной литературе обсуждается «возрождение» коклюша [11–13].

Проблема «возрождения» коклюша в практике здравоохранения свидетельствует о важности проведения исследований, направленных на повышение качества существующих вакцинных препаратов, которое характеризуется такими показателями, как специфическая токсичность и защитная активность (термины, принятые в рекомендациях ВОЗ и Европейской фармакопее)<sup>4</sup>.

Исследования по повышению защитной активности БКВ должны быть связаны с высокоперспективными направлениями: обнаружение новых защитных антигенов со стабильной структурой, которая не будет меняться в зависимости от селективного давления вакцины; поиск антигенов и адъювантов, корректирующих иммунный Th2-ответ (развивается после использования БКВ) в сторону ответов Th1 и Th17, индуцируемых естественной коклюшной инфекцией и ЦКВ [14]. Одной из важных особенностей новой коклюшной БКВ должна стать ее усиленная способность стимулировать противобактериальный иммунитет. При этом нужно учитывать, что полный цикл разработки новой вакцины – длительный процесс со значительными материальными вложениями.

Напротив, для коклюшной ЦКВ, которая характеризуется высокой защитной активностью и может стать эффективным препаратом при условии снижения ее реактогенности, по-видимому, возможны более простые решения. Одно из них – снижение числа клеток *B. pertussis* в дозе вакцины [15]. Другие подходы – совершенствование технологического процесса изготовления ЦКВ, а также селекция штаммов *B. pertussis*, позволяющая отобрать

при помощи генно-инженерной техники штаммы, продуцирующие приемлемые уровни токсинов [16–18].

В постинфекционном или поствакцинальном иммунитете определенную роль, до конца не ясную, играют бактериальные токсины *B. pertussis* – коклюшный токсин (КТ), дермонекротический токсин, трахеальный цитотоксин, аденилатциклаза и эндотоксин (липоолигосахарид, ЛОС). Возможна связь между некоторыми токсинами *B. pertussis* и проявлением реактогенности вакцины. Выявление токсического действия препарата – необходимый и важный этап характеристики безопасности вакцины. Используя в настоящей работе термин «показатель токсического действия» компонентов (ЛОС и КТ) вакцины, мы имеем в виду не количественное значение, определяемое каким-либо иммунохимическим методом, а условное, относительное понятие, так как токсическое действие в наших опытах выявлялось опосредованно – через изменение общей массы тела животных, и оценивалось в условных единицах.

Принято считать, что ЛОС и остаточное содержание активного КТ – главные факторы, определяющие реактогенность ЦКВ [19]<sup>5</sup>. В связи с этим представляется актуальным и важным дальнейшее изучение способности токсинов бактериальной клетки *B. pertussis* влиять на безопасность вакцины. Защитная активность – также один из основных и определяющих показателей качества ЦКВ, следовательно, необходимы исследования влияния ЛОС и КТ также и на этот показатель.

Цель работы – изучение токсического влияния липоолигосахарида *B. pertussis* и остаточного количества активного коклюшного токсина, присутствующих в цельноклеточной адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцине, на специфическую токсичность и защитную активность препарата.

Задачи исследования:

- определение токсического действия ЛОС и КТ *B. pertussis* в испытуемых сериях вакцины АКДС;
- проведение корреляционного анализа между показателями токсического действия ЛОС и КТ и показателями специфической токсичности и защитной активности коклюшного компонента, определенных в этих же сериях вакцины.

<sup>4</sup> Recommendations for whole-cell pertussis vaccine, Annex 6, TRS No 941. WHO; 2007. Pertussis vaccine (whole cell, adsorbed). European Pharmacopoeia 11.2. Strasbourg; 2023. 2.7.7. Assay of pertussis vaccine (whole cell). European Pharmacopoeia 11.2. Strasbourg; 2023.

<sup>5</sup> WHO Technical Report Series No. 941. Annex 6. Recommendations for whole-cell pertussis vaccine. WHO; 2007.

## Материалы и методы

Исследовано 57 коммерческих серий вакцины АКДС, поступивших в Испытательный центр экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, для подтверждения соответствия показателей качества препарата требованиям нормативной документации (НД). В цельноклеточном коклюшном компоненте вакцины АКДС определяли два основных показателя качества: защитную активность и специфическую токсичность. В документах Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) эти показатели соответствуют терминам *potency* и *specific toxicity*<sup>6</sup>.

По результатам испытаний 57 серий вакцины были разделены:

- группа 1 – 9 серий вакцины, не выдержавших испытания по показателю «Специфическая токсичность» (токсические свойства превышали допустимый уровень) и забракованных после исследования;
- группа 2 – 48 серий вакцины, соответствующих требованиям НД.

В опытах использовались мыши линии F1 CBA×C57Bl/6j. Все исследования проводились в соответствии с рекомендациями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях<sup>7</sup>, принципами этического кодекса CIOMS «Международные рекомендации по проведению биомедицинских исследований с использованием животных», Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях<sup>8</sup> (ГОСТ 33216–2014<sup>9</sup>).

Оценку вышеуказанных показателей качества препарата проводили по общепринятым в мировой практике методам, рекомендованным ВОЗ<sup>10</sup> и изложенным в ОФС.1.7.2.0005.15<sup>11</sup>

и ФС.3.3.1.0010.15<sup>12</sup> Государственной фармакопеи Российской Федерации (XIV изд.). Защитную активность определяли в тесте экспериментального менингоэнцефалита, в соответствии с которым мышам линии F1 CBA×C57Bl/6j, иммунизированным АКДС- и референс-вакцинами, интрацеребрально заражали вирулентным штаммом *B. pertussis* 18323. Через 14 сут учитывали число выживших и погибших животных, затем рассчитывали показатель защитной активности вакцины. В качестве референс-вакцины использовали фармакопейный стандартный образец иммуногенной активности коклюшной вакцины ФСО 3.2.00089 (ОСО 42-28-89)<sup>13</sup>, откалиброванный относительно 4-го Международного стандарта коклюшной вакцины, сер. 94/532.

Специфическую токсичность препарата (в %) определяли в тесте изменения массы тела (средние арифметические значения) мышам после внутрибрюшинного введения вакцины АКДС и оценивали по относительному показателю, который рассчитывали на 7-е сутки наблюдения как отношение приростов массы тела вакцинированных мышам и контрольных (им вводили физиологический раствор с консервантом в концентрации, соответствующей таковой в вакцине).

Считается, что колебания массы тела мышам в первые 16–24 ч после введения ЦКВ обусловлены присутствием в вакцине ЛОС, а действие КТ проявляется на 7-е сутки после введения препарата<sup>14</sup>.

Говоря о содержании и токсическом действии токсина в препарате, мы имели в виду не количественное значение, которое определяется каким-либо иммунохимическим методом, а условное, относительное, которое выявляется опосредованно через изменение массы тела опытных животных и оценивается в условных единицах. В настоящем исследовании определение токсического действия ЛОС и остаточного содержания активного КТ в коклюшном компоненте вакцины оценивали через изменения

<sup>6</sup> WHO Technical Report Series No. 941. Annex 6. Recommendations for whole-cell pertussis vaccine. WHO; 2007.

<sup>7</sup> [https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive\\_201063\\_rus.pdf](https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf)

<sup>8</sup> European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg; 1986. <https://norecopa.no/media/2iydns5h/ets-123-original.pdf>

<sup>9</sup> ГОСТ 33216–2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами.

<sup>10</sup> WHO Technical Report Series No. 941. Annex 6. Recommendations for whole-cell pertussis vaccine. WHO; 2007.

<sup>11</sup> ОФС.1.7.2.0005.15 Иммуногенность коклюшной суспензии и цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018. С. 2760–99.

<sup>12</sup> ФС.3.3.1.0010.15 Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная (АКДС-вакцина). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018. С. 5245–54.

<sup>13</sup> ФСО 3.2.00089 (ОСО 42-28-89). Стандартный образец иммуногенной активности коклюшной вакцины.

<sup>14</sup> WHO Technical Report Series No. 941. Annex 6. Recommendations for whole-cell pertussis vaccine. WHO; 2007.

массы тела мышей после введения им одной дозы вакцины АКДС. Исходили из того, что выявляемая токсичность пропорциональна содержанию ЛОС и КТ и характеризуется потерей массы мышей. Токсическое действие ЛОС оценивали по изменению массы тела мышей в первые 16–24 ч, а КТ – на 7-е сутки. С этой целью в обеих группах мышей определяли общую массу животных через 24 ч и на 7-е сутки после введения вакцины АКДС. Далее токсическое действие ЛОС выражали через разницу общей массы группы животных до начала испытания (исходная масса) и через 24 ч после него. Токсическое действие КТ рассчитывали как разницу между массой тела мышей на 7-е сутки (проявление действия КТ) и на 2-е (или 3-и) сутки, т.е. в тот период, когда у них восстанавливалась исходная масса тела (до действия ЛОС). Например, если исходная масса тела восстановилась на 2-е сутки, то токсическое действие КТ рассчитывали как разницу значений общей массы тела мышей, измеренной на 7-е и 2-е сутки. Полученные величины, выраженные в абсолютных (г) и относительных (%) значениях, отражали токсическое действие ЛОС и КТ. Абсолютные единицы массы (г) заменили на условные (усл. ед.), токсическое действие ЛОС и КТ выражали в усл. ед., а также через относительные (%) значения изменения массы мышей.

Между показателями специфической токсичности и защитной активности и значениями токсического действия ЛОС и КТ, полученными для этих же серий вакцины, проведен корреляционный анализ при помощи коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $r_s$ ), который позволяет определить полноту (силу) и направление корреляционной связи между двумя признаками [20]. Значение  $p$ -критерия для коэффициента Спирмена: меньше или равно 0,3 – показатель слабой полноты связи; в диапазоне между 0,4 и 0,7 – умеренной полноты связи; больше или равно 0,7 – высокой полноты связи. В корреляционном анализе использовали следующие пары результатов (значений), полученные при испытании одной и той же серии:

- токсическое действие ЛОС и КТ;
- специфическая токсичность (или защитная активность) вакцины.

Статистическую обработку данных проводили с применением программы Microsoft Office Excel 2007.

## Результаты и обсуждение

Образцы в группе 1 проявляли повышенную остаточную токсичность: показатели 9 серий вакцины, не соответствующих требованиям НД по показателю специфической токсичности,

не достигали 60% (табл. 1), требуемых НД. В таблице 1 приводятся следующие фактические данные: масса тела мышей после введения им дозы вакцины (0,5 мл) – в разные сроки после вакцинации; защитная активность вакцины, определенная в этих же образцах серий. Масса тела животных через 24 ч после введения препарата опосредованно отражает влияние токсического действия ЛОС, а на 7-е сутки – токсического действия остаточного содержания активного КТ.

Представленные в таблице 1 данные использовали в корреляционном анализе для определения взаимосвязи между значениями, отражающими токсическое действие ЛОС и КТ, и значениями специфической токсичности и защитной активности образцов вакцин. Так, для выявления взаимосвязи между токсическим действием ЛОС и специфической токсичностью препарата проводили корреляционный анализ между парами значений, отражающими потерю общей массы мышей в группе через 24 ч, и показателями специфической токсичности. Например, между парами –6,5 и 49, –6,1 и 49,4 и т.д. Для определения взаимосвязи между значениями, отражающими токсическое действие ЛОС, и показателями защитной активности использовали аналогичные пары значений, например –6,5 и 10,9, –6,1 и 9,5 и т.д.

Таким же образом выявляли взаимосвязь токсического действия остаточного уровня активного КТ и показателей специфической токсичности и защитной активности вакцины.

В таблице 2 представлены установленные значения коэффициентов корреляции между значениями токсического действия ЛОС и КТ и показателями специфической токсичности и защитной активности, определенными в этих же сериях вакцины АКДС.

Значение коэффициента корреляции (см. табл. 2) между показателями (в усл. ед.), отражающими токсическое действие ЛОС в разных сериях вакцины в группе 1, и показателями специфической токсичности для этих же серий вакцины составляет 0,899 ( $p < 0,01$ ), что выявляет прямую, высокую и достоверную тесноту связи. Та же зависимость между значениями токсического действия ЛОС (в %) и показателями специфической токсичности этих же серий характеризуется коэффициентом 0,851 ( $p < 0,05$ ), что подтверждает прямую, высокую и достоверную тесноту связи. Установленные в работе коэффициенты корреляции указывают на значительное влияние ЛОС на остаточную токсичность вакцины.

Корреляционный анализ между токсическим действием ЛОС (в усл. ед.) и защитной активно-

**Таблица 1.** Влияние коклюшного компонента серий вакцины АКДС с повышенной остаточной токсичностью на показатели качества препарата в группе 1 ( $n=9$ )

**Table 1.** Influence of the pertussis component of DTP vaccines with increased residual toxicity on the quality of vaccine batches in Group 1 ( $n=9$ )

Номер образца Sample No.	Масса тела мышей Total body weight of mice						Специфическая токсичность, % Specific toxicity, %	Защитная активность, МЕ/мл Potency, IU/mL
	До введения вакцины (исходная), г Before vaccine administration (baseline weight), g	После введения вакцины After vaccine administration						
		Через 24 ч In 24 h		На 2-е (или 3-и) сутки, г Day 2 (or 3), g	На 7-е сутки, г Day 7, g	Прирост за период между 2 (или 3) и 7-ми сутками, г (%) Weight gain between days 2 (or 3) and 7, g (%)		
		Абсолютное значение, г Absolute value, g	Изменение (от исходной массы), г (%) Weight loss (change from the baseline), g (%)					
1	153,9	147,4	-6,5 (-4,2)	156,1	178,9	22,8 (14,8)	49	10,9
2	152,5	146,4	-6,1 (-4,0)	155,8	177,7	21,9 (14,4)	49,4	9,5
3	142,1	136,1	-6,1 (-4,3)	143,7	176,3	32,6 (22,9)	53,1	13,9
4	146,0	135,4	-10,7 (-7,3)	147,5	165,0	17,5 (12,0)	41,9	14,8
5	147,8	134,8	-13,0 (-8,8)	153,5	163,8	10,3 (7,0)	40,5	15,6
6	148,5	138,1	-10,5 (-7,0)	154,5	165,0	10,5 (7,1)	36,5	12,3
7	156,7	153,2	-3,5 (-2,2)	159,0	188,7	29,7 (19,0)	59,8	8,3
8	146,5	–	–	147,8	166,7	18,9 (13,0)	32,8	15,1
9	152,3	148,9	-3,4 (-2,2)	157,1	199,0	41,9 (27,5)	58,8	12,9

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

*Примечание.* АКДС – адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина; «–» – не измеряли.

*Note.* DTP, adsorbed diphtheria-tetanus-pertussis vaccine; –, not measured.

стью коклюшного компонента вакцины показал обратную умеренную недостоверную тесноту связи ( $r_s=-0,589$ ,  $p>0,05$ ). Коэффициент корреляции между ЛОС (в %) и защитной активностью отражает обратную высокую достоверную тесноту связи ( $r_s=-0,756$ ,  $p<0,05$ ), что демонстрирует возможное отрицательное влияние ЛОС бактериальной клетки на индукцию противокклюшного иммунитета.

Токсическое действие остаточного уровня активного КТ, присутствующего в вакцине, коррелирует с полученными значениями специфической токсичности, демонстрируя прямую высокую тесноту связи:  $r_s=0,817$  ( $p<0,05$ ) – для значения, выраженного в усл. ед.;  $r_s=0,817$  ( $p<0,05$ ) – для значения, выраженного

в %. Можно заключить, что чем выше токсическое действие КТ, тем выше специфическая токсичность препарата.

Полученные результаты в группе 1 указывают на несколько более выраженное влияние ЛОС по сравнению с КТ, на формирование специфической токсичности вакцины. Для ЛОС, выраженного в усл. ед. и %, коэффициенты корреляции составили 0,899 ( $p<0,01$ ) и 0,851 ( $p<0,05$ ) соответственно. Коэффициенты для КТ (усл. ед. и %), отражающие корреляцию между токсическим действием КТ и показателями специфической токсичности: 0,817 ( $p<0,05$ ) и 0,817 ( $p<0,05$ ) соответственно.

Установлено, что три четверти поверхности клеточной стенки занимают молекулы ЛПС (или

**Таблица 2.** Влияние ЛОС и остаточного количества активного КТ на показатели специфической токсичности и защитной активности коклюшной ЦКВ в группе 1 ( $n=9$ )

**Table 2.** Effects of the *B. pertussis* LOS and residual active PT levels on the specific toxicity and potency of wP vaccine batches in Group 1 ( $n=9$ )

Показатель токсического действия <i>Toxic activity</i>	Значение коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $r_s$ ) для показателя <i>Spearman's rank correlation coefficient (<math>r_s</math>) for</i>	
	Специфическая токсичность вакцины, <i>p</i> -критерий <i>Specific toxicity, p-value</i>	Защитная активность вакцины, <i>p</i> -критерий <i>Potency, p-value</i>
ЛОС: <i>LOS:</i> – усл. ед. – а. у. – %	0,899, $p<0,01$ 0,851, $p<0,05$	–0,589, $p>0,05$ –0,756, $p>0,05$
КТ: <i>PT:</i> – усл. ед. – а. у. – %	0,817, $p>0,05$ 0,817, $p>0,05$	–0,45, $p>0,05$ –0,45, $p>0,05$

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

*Примечание.* ЛОС – липоолигосахарид *Bordetella pertussis*, КТ – коклюшный токсин *B. pertussis*; ЦКВ – цельноклеточная коклюшная вакцина.

*Note.* LOS, lipo-oligosaccharide; PT, pertussis toxin; wP, whole-cell pertussis vaccine; a.u., arbitrary units.

ЛОС в случае *B. pertussis*), остальное пространство занимают белки [21]. Возможно, значительное содержание ЛОС в клеточной стенке грамотрицательных бактерий обуславливает выраженное токсическое влияние на организм мыши [22].

Взаимосвязь между токсическим действием КТ в дозе вакцины и защитной активностью коклюшного компонента этой же серии препарата характеризуется обратной умеренной недостоверной теснотой связи. Так, для показателя токсического действия КТ, выраженного в усл. ед. и %, коэффициент корреляции одинаков:  $-0,45$  ( $p>0,05$ ).

Если сравнить влияние ЛОС и КТ на формирование противокклюшного иммунитета у животных, вакцинированных препаратами группы 1, то можно отметить, что ЛОС оказывает более выраженное отрицательное воздействие на защитную активность ЦКВ по сравнению с КТ: коэффициенты корреляции составили  $-0,756$  ( $p<0,05$ ) и  $-0,45$  ( $p>0,05$ ) для ЛОС и КТ соответственно.

В таблице 3 представлены результаты испытаний на мышах, вакцинированных сериями АКДС, соответствующими требованиям НД. Эти данные отражают влияние коклюшного компонента на показатели качества препарата.

Корреляционный анализ между токсическим действием ЛОС и КТ и показателями специфической токсичности и защитной активности серий вакцин АКДС в группе 2 (табл. 4) проводили аналогично анализу данных по группе 1.

Группы 1 и 2 значительно отличаются по показателю взаимосвязи между токсическим дей-

ствием ЛОС в дозе вакцины и специфической токсичностью вакцины: в группе 1 (вакцины с повышенной остаточной токсичностью) выявлена прямая высокая достоверная теснота связи; в группе 2 (вакцины, соответствующие требованиям) – слабая недостоверная. Так, коэффициенты корреляции для токсического действия ЛОС, выраженного в усл. ед. и %, в группе 2 составили  $0,113$  ( $p>0,05$ ) и  $0,121$  ( $p>0,05$ ) соответственно против  $0,899$  ( $p<0,01$ ) и  $0,851$  ( $p<0,05$ ) в группе 1 соответственно.

Так же резко отличаются обе группы по показателю взаимосвязи между токсическим действием ЛОС (в %) в одной дозе вакцины и защитной активностью данной серии вакцины: высокая обратная теснота связи показателей в группе 1 ( $-0,756$  ( $p<0,05$ )) и слабая и недостоверная связь в группе 2 ( $0,045$  ( $p>0,05$ )). Коэффициент корреляции, отражающий указанную взаимосвязь для показателя ЛОС (в усл. ед.), в группе 2 составил  $0,049$  ( $p>0,05$ ) против  $-0,756$  ( $p<0,05$ ) в группе 1.

Взаимосвязь между токсическим действием остаточного количества активного КТ и показателями специфической токсичности препарата по сравнению с группой 1 (высокая достоверная теснота связи) в группе 2 несколько иная – выявлена умеренная достоверная теснота связи. Так, коэффициент корреляции составил  $0,595$  ( $p<0,01$ ) для показателя токсического действия КТ, выраженного в усл. ед., и  $0,546$  ( $p<0,01$ ) – для такового, рассчитанного в %.

В группе 2 взаимосвязь между токсическим действием КТ и защитной активностью вакцины

**Таблица 3.** Влияние коклюшного компонента серий вакцины АКДС (n=48) на показатели качества препарата (группа 2)  
**Table 3.** Influence of the pertussis component of DTP vaccines on the quality of vaccine batches in Group 2 (n=48)

Номер образца <i>Sample No.</i>	Масса тела мышей <i>Total body weight of mice</i>						Специфическая токсичность, % <i>Specific toxicity, %</i>	Защитная активность, МЕ/мл <i>Potency, IU/mL</i>	
	До введения вакцины (исходная), г <i>Before vaccine administration (baseline weight), g</i>	После введения вакцины <i>After vaccine administration</i>							
		Через 24 ч <i>In 24 h</i>			На 2-е (или 3-и) сутки, г <i>Day 2 (or 3), g</i>	На 7-е сутки, г <i>Day 7, g</i>			Прирост за период между 2 (или 3) и 7-ми сутками, г (%) <i>Weight gain between days 2 (or 3) and 7, g (%)</i>
		Абсолютное значение, г <i>Absolute value, g</i>	Изменение (от исходной массы), г (%) <i>Weight loss (change from the baseline), g (%)</i>						
1	144,6	135,9	-8,7 (-6,0)	153,9	230,4	76,5 (52,9)	109,3	–	
2	147,2	149,3	2,2 (-1,5)	149,4	202,0	52,6 (35,7)	101,9	8,2	
3	152,4	140,8	-11,6 (-7,6)	153,1	220,1	67,0 (44,0)	100,1	8,0	
4	157,1	145,6	-11,5 (-7,3)	160,1	228,6	68,5 (43,6)	105,8	8,1	
5	151,3	147,4	-3,9 (-2,6)	157,5	215,0	57,5 (38,0)	78,4	8,9	
6	148,5	139,4	-9,1 (-6,1)	151,7	180,9	29,2 (19,7)	65,3	–	
7	158,3	152,8	-5,5 (-3,5)	160,0	201,8	41,8 (26,4)	63,8	–	
8	163,1	154,1	-9,0 (-5,5)	166,1	214,8	48,7 (29,9)	71,0	8,2	
9	159,1	152,5	-6,6 (-4,1)	162,5	213,4	50,9 (32,0)	74,5	–	
10	142,0	152,3	10,3 (-7,3)	152,3	202,1	49,8 (35,1)	101,5	8,0	
11	151,3	144,3	-7,0 (-4,6)	155,3	184,1	28,8 (19,0)	62,8	14,9	
12	149,2	144,7	-4,5 (-3,0)	149,2	186,3	37,1 (24,9)	70,0	8,2	
13	142,9	145,7	2,8 (-1,95)	150,9	193,6	42,7 (29,9)	60,7	11,2	
14	154,5	143,7	-10,8 (-6,9)	154,5	188,3	33,8 (21,9)	60,0	19,9	
15	152,6	145,4	-7,2 (-4,7)	154,3	189,0	34,7 (22,7)	65,7	–	
16	151,3	147,3	-4,0 (-2,6)	156,4	196,6	40,2 (26,6)	76,4	13,2	
17	147,4	139,8	-7,6 (-5,2)	147,4	182,4	35,0 (23,8)	60,0	12,3	
18	146,0	143,1	-2,9 (-2,0)	152,5	197,1	44,6 (30,6)	79,7	–	
19	153,8	146,9	-6,9 (-4,5)	156,8	195,1	38,3 (24,9)	64,6	8,9	
20	150,2	143,1	-7,1 (-4,7)	–	199,0	–	68,8	8,7	
21	147,2	149,7	2,2 (1,7)	149,7	188,2	38,5 (26,2)	67,1	16,9	
22	146,0	141,9	-4,1 (-2,8)	153,6	198,1	44,5 (30,5)	64,1	12,1	
23	148,2	144,7	-3,5 (-2,4)	151,7	191,4	39,7 (26,8)	68,2	8,2	
24	146,7	149,3	2,6 (-1,8)	149,3	193,8	44,5 (30,3)	74,4	14,1	
25	147,5	144,4	-3,1 (-2,1)	152,4	196,8	44,4 (30,1)	64,8	11,8	

Продолжение таблицы 3  
Table 3 (continued)

Номер образца Sample No.	Масса тела мышей Total body weight of mice						Специфическая токсичность, % Specific toxicity, %	Защитная активность, МЕ/мл Potency, IU/mL	
	До введения вакцины (исходная), г Before vaccine administration (baseline weight), g	После введения вакцины After vaccine administration							
		Через 24 ч In 24 h			На 2-е (или 3-и) сутки, г Day 2 (or 3), g	На 7-е сутки, г Day 7, g			Прирост за период между 2 (или 3) и 7-ми сутками, г (%) Weight gain between days 2 (or 3) and 7, g (%)
		Абсолютное значение, г Absolute value, g	Изменение (от исходной массы), г (%) Weight loss (change from the baseline), g (%)						
26	144,5	142,2	-2,3 (-1,6)	151,4	190,2	38,8 (26,9)	62,2	20,1	
27	144,1	141,6	-2,5 (-1,7)	151,0	188,9	37,9 (26,3)	61,0	12,1	
28	148,0	143,6	-4,4 (-2,9)	–	182,5	–	60,6	16,0	
29	150,2	145,5	-4,7 (-3,1)	153,0	188,3	35,3 (23,5)	70,3	9,9	
30	150,1	–	–	151,2	185,2	34,0 (22,7)	78,9	10,5	
31	147,0	–	–	152,8	179,6	26,8 (18,2)	73,3	17,8	
32	150,7	–	–	151,8	180,5	28,7 (19,0)	67,0	17,0	
33	148,5	–	–	150,3	178,8	28,5 (19,2)	68,1	15,2	
34	155,3	149,0	-6,3 (-4,1)	155,3	186,6	31,3 (20,2)	60,3	9,1	
35	148,4	140,8	-7,6 (-5,1)	149,4	183,4	34,0 (22,9)	60,1	8,7	
36	155,2	150,0	-5,2 (-3,4)	158,4	199,7	41,3 (26,6)	67,7	15,1	
37	151,2	152,5	1,3 (-0,9)	152,5	189,8	37,3 (24,7)	60,0	10,4	
38	145,9	141,1	-4,8 (-3,3)	152,4	198,6	46,2 (31,7)	76,7	9,9	
39	152,0	139,4	-12,6 (-8,3)	158,3	176,4	18,1 (11,9)	61,8	17,1	
40	141,6	137,2	-4,4 (-3,1)	143,2	178,1	34,9 (24,6)	60,3	16,2	
41	151,2	151,1	-0,1 (-0,07)	151,1	192,4	41,3 (27,3)	60,7	13,4	
42	147,8	145,1	-2,7 (-1,8)	152,0	187,7	35,7 (24,2)	70,7	11,2	
43	147,5	141,0	-6,5 (-4,4)	–	181,5	–	60,9	11,2	
44	149,5	145,3	-4,2 (-2,8)	151,4	185,4	34,0 (22,7)	62,5	13,7	
45	157,6	156,3	-1,3 (-0,8)	157,6	197,3	39,7 (25,2)	72,8	14,1	
46	149,7	149,6	-0,1 (-0,1)	149,7	206,7	57,0 (38,1)	74,3	9,3	
47	149,3	141,3	-8,0 (-5,4)	155,5	187,9	32,4 (21,7)	60,9	11,9	
48	147,5	140,3	-7,2 (-4,9)	147,5	189,8	42,3 (28,7)	60,7	12,9	

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

Примечание. АКДС – адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина; «–» – не измеряли.

Note. DTP, adsorbed diphtheria–tetanus–pertussis vaccine; –, not measured.

**Таблица 4.** Влияние ЛОС и остаточного количества активного КТ на показатели специфической токсичности и защитной активности коклюшной ЦКВ в группе 2 ( $n=48$ )

**Table 4.** Effects of the *B. pertussis* LOS and residual active PT levels on the specific toxicity and potency of wP vaccine batches in Group 2 ( $n=48$ )

Показатель токсического действия <i>Toxic activity</i>	Значение коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $r_s$ ) для показателя <i>Spearman's rank correlation coefficient (<math>r_s</math>) for</i>	
	Специфическая токсичность вакцины, $p$ -критерий <i>Specific toxicity, <math>p</math>-value</i>	Защитная активность вакцины, $p$ -критерий <i>Potency, <math>p</math>-value</i>
ЛОС: <i>LOS:</i> – усл. ед. – а. у. – %	0,113, $p>0,05$ 0,121, $p>0,05$	0,049, $p>0,05$ 0,045, $p>0,05$
КТ: <i>PT:</i> – усл. ед. – а. у. – %	0,595, $p<0,01$ 0,546, $p<0,0$	–0,534, $p<0,01$ –0,514, $p<0,01$

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

*Примечание.* ЛОС – липоолигосахарид *Bordetella pertussis*, КТ – коклюшный токсин *B. pertussis*; ЦКВ – цельноклеточная коклюшная вакцина.

*Note.* LOS, lipo-oligosaccharide; PT, pertussis toxin; wP, whole-cell pertussis vaccine; a.u., arbitrary units.

по сравнению с группой 1 осталась умеренной. При этом значения коэффициентов корреляции оказались несколько выше, а связь – достоверной. Так, коэффициенты корреляции составили:  $-0,557$  ( $p<0,01$ ) для показателя токсического действия КТ в усл. ед.,  $-0,534$  ( $p<0,01$ ) для такового, выраженного в %.

Если сравнить результаты исследования обеих групп, то можно отметить наиболее резкое отличие вакцин по корреляционным связям ЛОС. Так, если в группе 1 коэффициенты корреляции между показателями токсического действия ЛОС (в усл. ед. и %) и специфической токсичности отражали прямую высокую достоверную тесноту связи ( $0,899$  ( $p<0,01$ ) и  $0,851$  ( $p<0,05$ ) соответственно), то в группе 2 значения коэффициентов корреляции для тех же анализируемых показателей продемонстрировали прямую слабую недостоверную тесноту связи:  $0,113$  ( $p>0,05$ ) и  $0,121$  ( $p>0,05$ ) соответственно.

Аналогичные отличия наблюдались в отношении взаимосвязи токсического действия ЛОС (% усл. ед.) и защитной активности вакцины: высокая обратная достоверная связь ( $-0,756$  ( $p<0,05$ ) и  $-0,589$  ( $p>0,05$ ) соответственно) в группе 1; слабая недостоверная – в группе 2 ( $0,049$  ( $p>0,05$ ) и  $0,045$  ( $p>0,05$ ) соответственно).

Следует отметить, что взаимосвязь между токсическим действием КТ и специфической токсичностью вакцины в обеих группах принципиально не отличалась и была прямой и достоверной. Отличие заключалось в том, что в группе 1 связь была высокой ( $0,817$ ,  $p<0,05$ ), а в группе 2 – умеренной ( $0,595$  ( $p<0,01$ ) и  $0,546$  ( $p<0,05$ )). Взаи-

мосвязь между токсическим действием КТ и защитной активностью вакцины в группе 1 была недостоверной, в группе 2 – достоверной. Коэффициент корреляции между токсическим действием КТ и защитной активностью вакцины:  $-0,45$  ( $p>0,05$ ) в группе забракованных препаратов;  $-0,534$  ( $p<0,01$ ) и  $-0,514$  ( $p<0,01$ ) – в группе вакцин надлежащего качества.

Возможной причиной описанных выше различий может быть разное содержание токсинов в вакцинах групп 1 и 2. Можно предположить, что специфическая токсичность вакцины прямо пропорциональна содержанию ЛОС и КТ в препарате. В данном исследовании более выраженное токсическое действие ЛОС соответствовало более значительному снижению массы тела мышей через 24 ч, а более выраженное токсическое действие КТ – меньшему приросту массы тела на 7-е сутки. Очевидно, что изменение массы тела мышей после введения вакцины в описанном эксперименте напрямую отражает количественное содержание токсина в препарате. Чтобы оценить содержание ЛОС в вакцинах обеих групп, рассчитывались средние арифметические значения потери массы в первые 24 ч после вакцинации мышей. Установлено, что в группе 1 (повышенная остаточная токсичность вакцины) через 24 ч средняя арифметическая величина снижения массы тела животных составила  $-7,49$  усл. ед. с 95% доверительным интервалом (ДИ) в интервале  $-3,95...-11,03$ , или  $-7,2\%$  с 95% ДИ в интервале  $-3,48...-10,92$ . Для группы 2 (соответствующие требованиям НД вакцины) средняя арифметическая величина

потери в массе через 24 ч оказалась значительно меньше:  $-4,35$  усл. ед. с 95% ДИ в интервале  $-0,17...-8,87$ , или  $-2,85\%$  с 95% ДИ в интервале  $-0,16...-5,86$ . Мыши группы 1 (вакцинация препаратом с повышенной остаточной токсичностью) получили примерно в 2 раза больше ЛОС ( $7,49$  усл. ед.), чем мыши группы 2 ( $4,35$  усл. ед.).

Большее содержание ЛОС в вакцинах группы 1 обуславливает высокие значения коэффициентов корреляции между показателями ЛОС и специфической токсичности и защитной активности вакцин. Значительно меньшее количество ЛОС в вакцинах группы 2 практически не оказывает влияния на защитную активность и специфическую токсичность, определяемые общепринятым методом. Если рассмотреть обратную взаимосвязь, можно констатировать, что показатель специфической токсичности, полученный общепринятым методом, практически не отражает содержание ЛОС в вакцинах надлежащего качества. Показатель, оценивающий специфическую токсичность ЦКВ, рассчитывают как отношение прироста массы тела вакцинированных мышей между седьмыми и нулевыми сутками к приросту массы тела контрольной группы животных за этот же период, т.е. учитывают проявление действия КТ только на 7-е сутки после введения препарата. Однако в расчетах общепринятого показателя специфической токсичности практически не учитывается потеря в массе, характерная для действия ЛОС и происходящая через 16–24 ч после введения препарата, а также не принимается в расчет восстановление массы тела на 2-е (или 3-и) сутки.

Разное количественное содержание эндотоксина в разовой дозе вакцины отразилось как на специфической токсичности, так и на защитной активности ЦКВ, что установлено для обеих групп вакцин. Так, значительно большее количество ЛОС, присутствующее в вакцинах группы 1, оказало выраженное отрицательное влияние на формирование противококлюшного иммунитета. Выявлена обратная высокая достоверная теснота связи ( $-0,756$ ,  $p < 0,05$ ) между содержанием в дозе вакцины ЛОС и защитной активностью препарата. Взаимосвязь между токсическим действием ЛОС и защитной активностью оказалась значительно слабее в группе 2, в этих сериях вакцин содержание ЛОС было практически в два раза ниже по сравнению с группой 1.

Необходимо отметить, что в молекуле ЛОС (комплекс липида и олигосахарида) *B. pertussis* эндотоксической активностью обладает только липид [23], поэтому, рассчитывая потерю массы

животных в первые 24 ч после введения вакцины, по сути определяют токсическое действие липида, входящего в состав ЛОС. Таким образом, установив взаимосвязь между ЛОС (вычисленному по изменению массы тела животного) и показателями качества препарата, можно выявить взаимосвязь между влиянием липида ЛОС на организм и показателями специфической токсичности и защитной активности вакцины.

Оценку содержания КТ, как и ЛОС, проводили опосредованно, через определение изменения массы тела мышей (средняя арифметическая величина) после введения вакцины. Прирост массы тела мышей между 2 (или 3) и 7-ми сутками (отражает содержание КТ): в опыте с забракованными вакцинами (группа 1) составил  $22,43$  ( $14,40-30,46$ ) усл. ед., или  $14,98$  ( $9,55-20,41\%$ ); в исследовании с вакцинами, соответствующими требованиям НД (группа 2), оказался практически в два раза больше –  $40,24$  ( $30,88-49,60$ ) усл. ед., или  $26,25$  ( $20,13-32,37\%$ ). По-видимому, меньший прирост массы тела мышей ( $22,43$  усл. ед.), получивших дозы забракованных вакцин, обусловлен большей остаточной токсичностью КТ в данных сериях препарата. Большой прирост массы тела мышей ( $40,24$  усл. ед.) указывает на меньшую остаточную токсичность КТ в вакцинах надлежащего качества. Можно сделать вывод, что вакцины группы 1 содержали больше ЛОС и остаточного количества активного КТ и в связи с этим оказывали большее токсическое действие по сравнению с группой 2.

Необходимо отметить, что взаимосвязь между токсическим действием КТ в дозе препарата и специфической токсичностью в обеих группах принципиально не отличалась. Связь была прямой и достоверной, но коэффициент корреляции в группе 1 ( $0,817$  ( $p < 0,05$ ), высокая теснота связи) был больше, чем в группе 2 ( $0,595$  ( $p < 0,01$ ), умеренная взаимосвязь).

В вакцинах группы 1 повышенное токсическое действие КТ (в усл. ед.) достоверно не влияло на показатели защитной активности. В группе 2 (препарат с менее выраженным токсическим действием КТ), наоборот, выявлена отрицательная и достоверная взаимосвязь, т.е. препарат с меньшей остаточной токсичностью КТ индуцировал лучшую противококлюшную защиту у мышей, чем вакцины с повышенной остаточной токсичностью.

Учитывая, что в настоящем исследовании взаимосвязь КТ с показателями качества вакцины определялась по изменению массы тела мышей, т.е. по токсическому действию КТ, можно предположить, что таким образом выявляется взаимосвязь между субъединицей S1 КТ, обладающей

токсическими свойствами<sup>15</sup>, и показателями качества коклюшного компонента вакцины АКДС. Молекула КТ имеет сложную структуру, и представляется важным изучение влияния других ее субъединиц на формирование адаптивного противокклюшного иммунитета.

Представленные результаты демонстрируют, что токсины ЛОС и КТ, являясь основными факторами вирулентности бактериальной клетки *B. pertussis* [24], активно влияют на формирование иммунного ответа, что подтверждается рассчитанными коэффициентами корреляции.

В ряде работ показано, что ЛОС как консервативный молекулярный паттерн участвует в обеспечении жизненно важных для бактериальной клетки функций, играет важную роль в патогенезе коклюшной инфекции [25, 26]; обеспечивает структурную целостность бактериальной клетки и защищает мембрану от агрессивных воздействий окружающей среды [23]; выполняет иммуномодулирующую функцию, способствует трансформации врожденного иммунитета в адаптивный [27]; задействован в дифференцировке наивных Т-клеток в Т-хелперы типа 1 (Th1) [28], активно участвуя в формировании эффективного иммунного ответа [24, 29, 30]; защищает бактериальную клетку *B. pertussis* от действия врожденного иммунитета хозяина [31]. В ответ на воздействие ЛОС клеточной стенки *B. pertussis* организм хозяина вырабатывает нейтрализующие антитела, обладающие способностью к прямому уничтожению бактериальных клеток. В научной литературе высказывается мнение, что иммуногенная активность в определенной степени обусловлена внутренним олигосахаридным ядром молекулы ЛОС. Установлено, что олигосахарид ядра, имеющий отрицательный заряд, за счет ионного взаимодействия усиливает сродство к рецепторному комплексу TLR4 и MD-2 дендритных клеток, активация которых запускает иммунный ответ [32, 33]. И наоборот, для липида А молекулы ЛОС характерна пониженная способность активировать комплекс рецепторов TLR4 и MD-2 [34–36].

Гипотетически можно объяснить полученные в настоящем исследовании данные. Взаимосвязь между показателями ЛОС (вероятное влияние липида молекулы) и защитной активности в группе 1 характеризуется коэффициентами корреляции, равными  $-0,589$  ( $p > 0,05$ , обратная умеренная недостоверная связь) и  $-0,756$  ( $p < 0,05$ , обратная сильная достоверная связь) соответственно; в группе 2 слабая недостоверная

связь –  $0,049$  ( $p > 0,05$ ) и  $0,045$  ( $p > 0,05$ ) соответственно. Если предположить, что отрицательная и слабая взаимосвязь в группах 1 и 2 в определенной степени обусловлена пониженной способностью липида А активировать рецепторы TLR4 и MD-2 дендритных клеток, то вполне вероятно отрицательное влияние липида А на формирование адаптивного противокклюшного иммунитета.

Корреляционный анализ, проведенный между основными показателями качества вакцины и остаточным количеством активного КТ и ЛОС, продемонстрировал и подтвердил существенное влияние указанных токсинов на специфическую токсичность и защитную активность препарата. В исследовании получены ожидаемые данные, свидетельствующие о наличии взаимосвязи КТ и высоких доз ЛОС со специфической токсичностью. Продемонстрировано, что содержание ЛОС, входящего в состав препаратов надлежащего качества (группа 2), не выявляется общепринятым в мировой практике методом оценки безопасности коклюшной вакцины, рекомендованным ВОЗ. Установлена обратная взаимосвязь между токсическим действием ЛОС и КТ и защитной активностью вакцины.

Представляется очевидным, с учетом выраженного токсического действия ЛОС на организм человека, что необходимо определять содержание этого компонента в коклюшных штаммах, используемых для производства ЦКВ (в настоящее время в Российской Федерации это не практикуется).

Полученные в работе данные могут способствовать дальнейшей разработке подходов к снижению специфической токсичности и повышению защитной активности ЦКВ. Изучение токсинов ЛОС и КТ и ответных реакций организма имеет важное значение для разработки оптимальных вакцин для профилактики коклюша.

## Выводы

1. Было выявлено и опосредованно оценено токсическое действие липоолигосахарида и остаточного количества активного коклюшного токсина в образцах исследуемых серий адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцины.
2. Корреляционный анализ продемонстрировал наличие обратной связи между защитной активностью вакцины и токсическим действием остаточного уровня активного коклюшного токсина, входящего в состав серий адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбняч-

<sup>15</sup> WHO Immunological basis for immunization series. Module 4: Pertussis. WHO; 2017.

ной вакцины, удовлетворяющих требованиям нормативной документации.

- Показатель, оценивающий специфическую токсичность цельноклеточной коклюшной вакцины в соответствии с рекомендациями ВОЗ, не отражает присутствие, содержание и токсическое действие липоолигосахарида в сериях исследуемой вакцины, соответ-

ствующих требованиям нормативной документации.

- Представляется целесообразным в используемых для изготовления цельноклеточной вакцины коклюшных штаммах определять содержание липоолигосахарида *B. pertussis*, что в настоящее время не принято в производственной практике в Российской Федерации.

## Литература/References

- Wirsing von König CH, Campins-Martí M, Finn A, Guiso N, Mertsola J, Liese J. Pertussis immunization in the global pertussis initiative European region: recommended strategies and implementation considerations. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(5 Suppl):S87–92. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000160920.75623.a3>
- Simondon F, Preziosi MP, Yam A, Kane CT, Chabirand L, Iteman I, et al. A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal. *Vaccine*. 1997;15(15):1606–12. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(97\)00100-x](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(97)00100-x)
- Winter K, Harriman K, Zipprich J, Schechter R, Talarico J, Watt J, Chavez G. California pertussis epidemic, 2010. *J Pediatr*. 2012;161(6):1091–6. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.05.041>
- Libster R, Edwards KM. Re-emergence of pertussis: what are the solutions? *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(11):1331–46. <https://doi.org/10.1586/erv.12.118>
- McGirr A, Fisman DN. Duration of pertussis immunity after DTaP immunization: a meta-analysis. *Pediatrics*. 2015;135(2):331–43. <https://doi.org/10.1542/peds.2014-1729>
- Pertussis vaccines: WHO position papers. *Wkly Epidemiol Rec*. 1999;74(18):137–44.
- Pertussis vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2010;85(40):385–400. PMID: 20939150
- Lugauer S, Heining U, Cherry JD, Stehr K. Long-term clinical effectiveness of an acellular pertussis component vaccine and a whole cell pertussis component vaccine. *Eur J Pediatr*. 2002;161(3):142–6. <https://doi.org/10.1007/s00431-001-0893-5>
- Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, Cotter PA. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(4):274–88. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3235>
- Witt MA, Arias L, Katz PH, Truong ET, Witt DJ. Reduced risk of pertussis among persons ever vaccinated with whole cell pertussis vaccine compared to recipients of acellular pertussis vaccines in a large US cohort. *Clin Infect Dis*. 2013;56(9):1248–54. <https://doi.org/10.1093/cid/cit046>
- Klein NP, Bartlett J, Fireman B, Baxter R. Waning Tdap effectiveness in adolescents. *Pediatrics*. 2016;137(3):e20153326. <https://doi.org/10.1542/peds.2015-3326>
- Liko J, Robison SG, Cieslak PR. Priming with whole-cell versus acellular pertussis vaccine. *N Engl J Med*. 2013;368(6):581–2. <https://doi.org/10.1056/nejmc1212006>
- Klein NP, Bartlett J, Fireman B, Rowhani-Rahbar A, Baxter R. Comparative effectiveness of acellular versus whole-cell pertussis vaccines in teenagers. *Pediatrics*. 2013;131(6):e1716–22. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-3836>
- Warfel JM, Edwards KM. Pertussis vaccines and the challenge of inducing durable immunity. *Curr Opin Immunol*. 2015;35:48–54. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.05.008>
- Чупринина РП, Алексеева ИА. Возможность повышения иммуногенной активности и стабильности цельноклеточного коклюшного компонента комбинированных вакцин. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014;(2):89–95.
- Чупринина РП, Алексеева ИА. The possibility of increasing the potency and stability of whole-cell pertussis component of combined vaccines. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2014;(2):89–95 (In Russ.). EDN: SBEUOR
- Hozbor D. New pertussis vaccines: a need and a challenge. In: Fedele G, Ausiello C, eds. *Pertussis infection and vaccines. Advances in experimental medicine and biology*. Springer; 2019. P. 115–26. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2019\\_407](https://doi.org/10.1007/5584_2019_407)
- Locht C, Papin JF, Lecher S, Debré AS, Thalen M, Solovay K, et al. Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 protects baboons against *Bordetella pertussis* disease and infection. *J Infect Dis*. 2017;216(1):117–24. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix254>
- Li P, Asokanathan C, Liu F, Khaing KK, Kmiec D, Wei X, et al. PLGA nano/micro particles encapsulated with pertussis toxin (PTd) enhances Th1/Th17 immune response in a murine model. *Int J Pharm*. 2016;513(1–2):183–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.08.059>
- Barkoff AM, Knuutila A, Mertsola J, He Q. Evaluation of anti-PT antibody response after pertussis vaccination and infection: the importance of both quantity and quality. *Toxins (Basel)*. 2021;13(8):508. <https://doi.org/10.3390/toxins13080508>
- Зубов НН, Кувакин ВИ, Умаров СЗ. *Биомедицинская статистика: информационные технологии анализа данных в медицине и фармации*. М.: RuScience; 2023. Zubov NN, Kuvakin VI, Umarov SZ. *Biomedical statistics: information technologies of data analysis in medicine and pharmacy*. Moscow: RuScience; 2023 (In Russ.).
- Nikaido H, Vaara M. Outer membrane. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberg HE, eds. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium – cellular and molecular biology*. Washington DC: ASM; 1987. P. 7–22.
- Whitfield C, Trent MS. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochem*. 2014;83:99–128. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035600>
- Sperandeo P, Martorana AM, Polissi A. Lipopolysaccharide biogenesis and transport at the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862(11):1451–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.10.006>
- Pittman M. Pertussis toxin: the cause of the harmful effects and prolonged immunity of whooping cough. A hypothesis. *Rev Infect Dis*. 1979;1(3):401–12. <https://doi.org/10.1093/clinids/1.3.401>
- Koj S, Lugowski C, Niedziela T. *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide-derived neoglycoconjugates – new components of pertussis vaccine. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015;69:1013–30 (In Pol.). PMID: 26400888
- Flak TA, Goldman WE. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol*. 1999;1(1):51–60. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.1999.00004.x>

27. Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KHG. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol*. 2006;177(11):7980–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.7980>
28. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(12):984–93. <https://doi.org/10.1038/nri1246>
29. Arenas J, Pupo E, Phielix C, David D, Zariri A, Zamyatina A, et al. Shortening the lipid A acyl chains of *Bordetella pertussis* enables depletion of lipopolysaccharide endotoxic activity. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(4):594. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040594>
30. Trollfors B, Lagergard T, Taranger J, Bergfors E, Schneerson R, Robbins JB. Serum immunoglobulin G antibody responses to *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide and B. parapertussis lipopolysaccharide in children with pertussis and parapertussis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8(5):1015–7. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.5.1015-1017.2001>
31. Schaeffer LM, McCormack FX, Wu H, Weiss AA. *Bordetella pertussis* lipopolysaccharide resists the bactericidal effects of pulmonary surfactant protein A. *J Immunol*. 2004;173(3):1959–65. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.1959>
32. Zahringer U, Ittig, S, Lindner B, Moll H, Schombel U, Gisch N, Cornelis GR. NMR-based structural analysis of the complete rough-type lipopolysaccharide isolated from *Capnocytophaga canimorsus*. *J Biol Chem*. 2014;289(34):23963–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.571489>
33. Raetz CRH, Garrett TA, Reynolds CM, Shaw WA, Moore JD, Smith DCJ Jr, et al. Kdo2-lipid A of *Escherichia coli*, a defined endotoxin that activates macrophages via TLR-4. *J Lipid Res*. 2006;47(5):1097–111. <https://doi.org/10.1194/jlr.m600027-jlr200>
34. Needham BD, Carroll SM, Giles DK, Georgiou G, Whiteley M, Trent MS. Modulating the innate immune response by combinatorial engineering of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(4):1464–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218080110>
35. Needham BD, Trent MS. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(7):467–81. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3047>
36. Teghanemt AD, Zhang D, Levis EN, Weiss JP, Giannini TL. Molecular basis of reduced potency of underacylated endotoxins. *J Immunol*. 2005;175(7):4669–76. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4669>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **И.А. Алексеева** – обоснование концепции исследования, разработка дизайна экспериментального исследования, анализ и систематизация экспериментальных данных, формулировка выводов, написание текста рукописи. **И.В. Ибрагимхалилова** – анализ и обобщение данных литературы; проведение испытаний вакцины, работа с графическим материалом. **Д.Н. Лепихова** – анализ и обобщение данных литературы; проведение испытаний вакцины, работа с графическим материалом.

**Соответствие принципам этики.** Все исследования проводились в соответствии с рекомендациями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, принципами этического кодекса CIOMS «Международные рекомендации по проведению биомедицинских исследований с использованием животных», Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ГОСТ 33216–2014).

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **I.A. Alekseeva** substantiated the study concept, designed the experiment, analysed and collated the experimental data, formulated the conclusions, and drafted the manuscript. **I.V. Ibragimkhalilova** analysed and summarised literature data, conducted vaccine tests, and prepared graphical material. **D.N. Lepikhova** analysed and summarised literature data, conducted vaccine tests, and prepared graphical material.

**Ethics approval.** All the experiments were performed according to the recommendations of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes, the CIOMS International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, and European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (GOST 33216–2014).

## Об авторах / Authors

**Алексеева Ирина Андреевна**, д-р. мед. наук,  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5586-2933>  
[Alekseeval@expmed.ru](mailto:Alekseeval@expmed.ru)

**Ибрагимхалилова Ильхамья Вейсаловна**,  
канд. биол. наук,  
ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-8002-2407>  
[ibragimhalilova@expmed.ru](mailto:ibragimhalilova@expmed.ru)

**Лепихова Дарья Николаевна**  
ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-4061-8892>  
[lepihovadn@expmed.ru](mailto:lepihovadn@expmed.ru)

Поступила 25.01.2023

После доработки 01.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

**Irina A. Alekseeva**, Dr. Sci. (Med.),  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5586-2933>  
[Alekseeval@expmed.ru](mailto:Alekseeval@expmed.ru)

**Ilkhamya V. Ibragimkhalilova**, Cand. Sci. (Biol),  
ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-8002-2407>  
[ibragimhalilova@expmed.ru](mailto:ibragimhalilova@expmed.ru)

**Darya N. Lepikhova**  
ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-4061-8892>  
[lepihovadn@expmed.ru](mailto:lepihovadn@expmed.ru)

Received 25 January 2023

Revised 1 August 2023

Accepted 13 September 2023