



Экспериментальная оценка возможности определения бактериальных эндотоксинов с помощью гель-тромб теста в вакцине брюшнотифозной Ви-полисахаридной

М.В. Абрамцева ✉, Н.С. Алехина, Е.Д. Колышкина

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

✉ Абрамцева Марина Витальевна; Abramtceva@expmed.ru

Резюме

Актуальность. Оценка содержания пирогенных примесей в вакцине брюшнотифозной Ви-полисахаридной (Вианвак®) проводится в настоящее время только биологическим тестом на пирогенность. Определение бактериальных эндотоксинов (БЭ) с помощью гель-тромб теста и введение показателя «Бактериальные эндотоксины» в нормативную документацию на препарат позволят существенно повысить надежность контроля качества данной вакцины, а также гармонизировать требования к ней с требованиями ведущих фармакопей мира к данной группе лекарственных препаратов.

Цель. Экспериментальная оценка возможности определения содержания бактериальных эндотоксинов с помощью гель-тромб теста в брюшнотифозной Ви-полисахаридной вакцине.

Материалы и методы. Образцы вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной (раствор для подкожного введения, 0,5 мл/доза) пяти серий; ЛАЛ-реактив; ТАЛ-реактив. Испытания проводились с использованием гель-тромб теста с учетом требований Государственной фармакопеи Российской Федерации (ОФС.1.2.4.0006.15) и теста на пирогенность согласно ОФС.1.2.4.0005.15.

Результаты. Расчетное предельное содержание БЭ в испытуемой вакцине составляет 96 ЕЭ/мл, значение максимально допустимого разведения (МДР) – 3200. Установлены нормативные требования к качеству вакцины по показателю «Бактериальные эндотоксины» (не более 48 ЕЭ/доза). Выявлено наличие БЭ в разведениях препарата 1/16–1/32 и отсутствие – в разведениях 1/64–1/256. Выбрано и валидировано рабочее разведение препарата 1/128. Полученные значения содержания БЭ в исследуемых образцах находятся в диапазоне от 0,24 до 0,48 ЕЭ/доза. Испытания на пирогенность *in vivo* образцов пяти серий вакцины в разведениях от 1/16 до 1/256 показали, что введение животным препарата в разведениях 1/16–1/128 вызывало пирогенную реакцию, а при введении вакцины в разведении 1/256 пирогенная реакция отсутствовала во всех экспериментах.

Выводы. Экспериментально доказана возможность определения бактериальных эндотоксинов в вакцине брюшнотифозной Ви-полисахаридной с помощью гель-тромб теста. Рекомендовано введение показателя «Бактериальные эндотоксины» в Государственную фармакопею Российской Федерации ФС.3.3.1.0012.15 «Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная».

Ключевые слова: бактериальные эндотоксины; гель-тромб тест; вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная; ЛАЛ-тест; тест на пирогенность

Для цитирования: Абрамцева М.В., Алехина Н.С., Колышкина Е.Д. Экспериментальная оценка возможности определения бактериальных эндотоксинов с помощью гель-тромб теста в вакцине брюшнотифозной Ви-полисахаридной. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2023;23(4):570–583. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-570-583>

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.

Experimental evaluation of the possibility of determining bacterial endotoxins in typhoid Vi polysaccharide vaccines using the gel-clot test

Marina V. Abramtseva , Natalya S. Alekhina, Elena D. Kolyshkina

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

 Marina V. Abramtseva; Abramtseva@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. Currently, only the rabbit pyrogen test is used to test the Vianvac® typhoid Vi polysaccharide vaccine for pyrogenicity. As part of the product specification file, the gel-clot test for bacterial endotoxins (BE) will improve the reliability of quality control, as well as harmonise the requirements for the vaccine with the requirements outlined for this group of medicinal products by leading world pharmacopoeias.

Aim. This study aimed at an experimental assessment of the applicability of the gel-clot test to the quantification of BE in the typhoid Vi polysaccharide vaccine.

Materials and methods. This study used samples from 5 batches of the typhoid Vi polysaccharide vaccine (0.5 mL/dose, solution for subcutaneous injection), LAL and TAL reagents. The analysis included the gel-clot test and the pyrogenicity test according to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (OFS.1.2.4.0006.15 and OFS.1.2.4.0005.15, respectively).

Results. According to calculations, the BE limit for the tested vaccine was 96 EU/mL, and the maximum valid dilution (MVD) was 3200. The authors determined the regulatory requirements for typhoid Vi polysaccharide vaccine quality in terms of BE (not more than 48 EU/dose). The *in vitro* BE tests were positive at vaccine dilutions of 1/16 to 1/32 and negative at 1/64 to 1/256. The authors selected and validated a working vaccine dilution of 1/128. The BE content measured in the tested samples ranged from 0.24 to 0.48 EU/dose. The *in vivo* pyrogen tests were positive at dilutions of 1/16 to 1/128 and negative at 1/256 in all experiments with samples from 5 vaccine batches at dilutions ranging from 1/16 to 1/256.

Conclusions. This study has experimentally proven that the gel-clot test can quantify BE in the typhoid Vi polysaccharide vaccine. The authors have recommended introducing the gel-clot BE test in the monograph of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation on the typhoid Vi polysaccharide vaccine (FS.3.3.1.0012.15).

Keywords: bacterial endotoxins; gel-clot test; typhoid Vi polysaccharide vaccine; LAL test; pyrogen test

For citation: Abramtseva M.V., Alekhina N.S., Kolyshkina E.D. Experimental evaluation of the possibility of determining bacterial endotoxins in typhoid Vi polysaccharide vaccines using the gel-clot test. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2023;23(4):570–583. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-570-583>

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 reporting No. 121022000147-4).

Disclosure. The authors declare having no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

В Российской Федерации для специфической профилактики брюшного тифа применяется вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная, которая содержит в своем составе капсульный полисахарид (Ви-антиген), извлеченный из супернатанта культуры *Salmonella typhi*. Одна доза препарата содержит 25 мкг Ви-антигена¹.

Контроль качества вакцинных препаратов согласно Государственной Фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) должен включать в себя испытания по показателям «Пирогенность» биологическим методом на кроликах *in vivo* и/или «Бактериальные эндотоксины»² с применением методики *in vitro*, основанной на использовании лизата амебоцитов мечехвоста (ЛАЛ-тест), которая может быть выполнена тремя различными подходами (гель-тромб тест, турбидиметрический метод, хромогенный метод)³.

В соответствии с нормативной документацией на вакцину брюшнотифозную Ви-полисахаридную определение содержания в ней пирогенных примесей проводится биологическим тестом на пирогенность⁴.

Основными недостатками теста на пирогенность являются использование лабораторных животных, невозможность количественной оценки содержания пирогенных примесей [1], высокая вариабельность результатов и зависимость результата испытания от индивидуальной чувствительности животного [2]. Кроме того, к минусам метода относятся высокая стоимость и трудозатратность [1]. Испытание способно вызывать стресс у животных из-за длительности и инвазивности процедуры, что может привести к получению некорректных результатов [3]. Биологический тест на пирогенность никогда не был валидирован, и его результаты не могут быть экстраполированы на человека [3].

Согласно требованиям Евразийской экономической комиссии («Руководство по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата»)⁵ определение

бактериальных эндотоксинов (БЭ) с помощью ЛАЛ-теста является основным тестом для испытания парентеральных лекарственных препаратов. К преимуществам ЛАЛ-теста относят возможность проведения полуколичественного или количественного определения содержания БЭ [4], высокую чувствительность, хорошую воспроизводимость результатов⁶. Кроме того, метод отличается простотой выполнения, возможность анализировать значительное количество образцов за короткий промежуток времени и экономичность [1]. Внедрение ЛАЛ-теста в лабораторную практику способствовало существенному сокращению числа животных, используемых в испытаниях [5]. Однако высокая специфичность в отношении липополисахаридов грамотрицательных бактерий ограничивает возможности ЛАЛ-теста для мониторинга пирогенности и потенциальной иммунной активации, опосредованной другими пирогенными примесями. ЛАЛ-тест не способен обнаруживать широкий спектр биологически значимых пирогенов, таких как липопроотеины, пептидогликаны и липотейхоевые кислоты грамположительных бактерий [5, 6]. Это во многих случаях исключает полный отказ от испытания на пирогенность [7]. Несмотря на то что чувствительность ЛАЛ-теста значительно превышает чувствительность теста на кроликах, испытание *in vivo* считается более универсальным и позволяет выявить наличие в лекарственном препарате пирогенных загрязнений любой природы [8, 9].

Таким образом, тест на пирогенность и ЛАЛ-тест являются однонаправленными, но не аналогичными ввиду различий в чувствительности и специфичности к пирогенным примесям [3, 8].

Требования Европейской фармакопеи⁷ и Британской фармакопеи⁸ к брюшнотифозным полисахаридным вакцинам предусматривают определение БЭ с помощью ЛАЛ-теста, исключая проведение испытания на пирогенность *in vivo*. Фармакопея США⁹ допускает оба метода оценки

¹ ФС.3.3.1.0012.15 Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

² ОФС.1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

³ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁴ ФС.3.3.1.0012.15 Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁵ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 07.09.2018 № 151 «Руководство по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата».

⁶ Неугодова Н.П., Долгова Г.В., Ситников А.Г. Достоинство ЛАЛ-теста как средства контроля качества лекарственных средств. ЛАЛ-тест. 2003;(2):6–8.

⁷ Monograph 1160. Typhoid polysaccharide vaccine. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2019.

⁸ Typhoid polysaccharide vaccine. British Pharmacopoeia; 2020.

⁹ USP 41–NF 39 <1234> Vaccines for human use – polysaccharide and glycoconjugate vaccines; 2021.

пирогенных примесей в зависимости от нормативных требований к конкретному лекарственному препарату.

Обобщая изложенные литературные данные и регуляторные требования, можно заключить, что определение БЭ с помощью гель-тромб теста и включение показателя «Бактериальные эндотоксины» в нормативную документацию на отечественную вакцину брюшнотифозную Ви-полисахаридную позволит значительно повысить надежность контроля, а также гармонизировать подходы к оценке ее качества с требованиями зарубежных фармакопей. Выбор гель-тромб теста обусловлен его доступностью, простотой, экономичностью и хорошей воспроизводимостью результатов [5, 10].

Цель работы – экспериментальная оценка возможности определения БЭ с помощью гель-тромб теста в брюшнотифозной Ви-полисахаридной вакцине. Для выполнения данной цели были поставлены следующие задачи:

- рассчитать предельное содержание БЭ в испытуемом препарате и значение максимально допустимого разведения (МДР);
- подтвердить заявленную чувствительность ЛАЛ-реактива;
- определить рабочее разведение вакцины и провести испытания на наличие в ней мешающих факторов;
- произвести оценку пирогенности испытуемого препарата биологическим методом *in vivo* в разведениях, близких к рабочему, определенному по результатам ЛАЛ-теста;
- провести сравнение данных, полученных в испытаниях с помощью ЛАЛ-теста и при оценке пирогенности *in vivo*.

Материалы и методы

Материалы:

- образцы вакцины Вианвак® (вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная), раствор для подкожного введения, 0,5 мл/доза, производства ООО «Гритвак», Россия; серии № 400-0520, 402-0620, 414-0922, 406-0721, 413-0522 (2020–2022 гг. выпуска);
- ЛАЛ-реактив и контрольный стандарт эндотоксина (Charles River Endosafe, США);
- ТАЛ-реактив и контрольный стандарт эндотоксина (Xiamen Bioendo Technology Co., Ltd, Китай);
- вода для ЛАЛ-теста «AL-WATER» (ООО «Альгимед Техно», Россия);

- натрия хлорид 0,9%, растворитель для приготовления лекарственных форм для инъекций (ОАО «Дальхимфарм», Россия);
- наконечники для автоматических дозаторов (Eppendorf, Германия; Sartorius, Германия);
- круглодонные пробирки с диаметром 10 и 13 мм (ООО «Альгимед Техно», Россия);
- пробирки центрифужные 50 мл (Corning, США);
- шприцы инъекционные однократного применения с номинальным объемом 3,0 см³ (SFM Hospital Products, Германия).

Оборудование:

- баня водяная (GFL 1003, Германия);
- автоматические дозаторы с переменным объемом 20–200 и 10–100 мкл (Eppendorf, Германия) и 0,5–5000 мкл (Sartorius, Германия);
- перемешивающее устройство типа Vortex (Elmi, Латвия);
- pH/Ion-метр SevenCompact S220 (Mettler Toledo, КНР);
- весы электронные BD-590 (Tanita, Япония);
- термометр медицинский электронный МТ-1931 (Microlife, Швейцария).

Методы

Гель-тромб тест (метод В)¹⁰. Исследуемые образцы вакцины разводили водой для ЛАЛ-теста. Приготовленные разведения по 0,1 мл вносили в круглодонные депирогенизированные пробирки, после чего в каждую пробирку добавляли по 0,1 мл ЛАЛ-реактива, предварительно разведенного водой для ЛАЛ-теста. Далее реакционные смеси тщательно перемешивали и инкубировали в водяной бане при температуре 37 °С, после чего каждую пробирку плавно переворачивали на 180° и оценивали наличие в ней плотного геля, образование которого говорит о положительной реакции и присутствии в смеси БЭ. Все испытания проводились в двойной повторности, опыты сопровождалось положительным и отрицательным контролями.

Испытание на пирогенность *in vivo*¹¹. В эксперименте использовали кроликов породы Советская шиншилла весом 2,0–3,5 кг. Исследуемые образцы разводили стерильным раствором натрия хлорида 0,9% для инъекций. Выбор диапазона разведений вакцины был основан на результатах гель-тромб теста. Раствор вводили в краевую ушную вену кролика из расчета 1 мл на 1 кг веса животного. Для каждого опытного образца испытание проводили на трех кроликах. Согласно ГФ РФ¹²

¹⁰ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹¹ ОФС.1.2.4.0005.15 Пирогенность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹² Там же.

реакция на введение препарата считается пирогенной, если сумма наибольших повышений температур ($\Sigma\Delta T_{\max}$) $>1,2$ °C или хотя бы у одного из кроликов отмечено повышение температуры (ΔT_{\max}) на 0,6 °C и выше. Экспериментальные животные содержались в условиях вивария в соответствии с ГОСТ 33044-2014¹³. Работы с лабораторными животными выполняли на основе стандартных операционных процедур, принятых в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, в соответствии с правилами Европейской Конвенции ETS № 123¹⁴ и директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/EU¹⁵. Публикация научной статьи была одобрена на заседании локального этического комитета «ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России» (протокол заседания № 3 от 26.09.2023).

Результаты и обсуждение

Расчет предельного содержания бактериальных эндотоксинов

Значение предельного содержания БЭ (ПС БЭ) рассчитывается по формуле (1)¹⁶:

$$\text{ПС БЭ} = \frac{K}{M}, \quad (1)$$

где K – пороговая пирогенная доза, равная 5 ЕЭ/кг в 1 час при парентеральном пути введения препарата; M – максимальная терапевтическая доза препарата, вводимая в течение 1 ч (в мг, мл, ЕД на 1 кг массы тела).

Согласно Инструкции по медицинскому применению¹⁷ объем однократного подкожного введения вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной составляет 0,5 мл; вакцинация предусмотрена для взрослых и детей в возрасте

от трех лет. Для обеспечения жестких требований в расчете учтено наименьшее значение веса ребенка в возрасте трех лет – 9,6 кг (по данным ВОЗ)¹⁸. Соответственно, ПС БЭ рассчитывается по формуле (2):

$$\text{ПС БЭ} = \frac{5 \text{ ЕЭ/кг} \times 9,6 \text{ кг}}{0,5 \text{ мл}} = 96 \frac{\text{ЕЭ}}{\text{мл}} \text{ или } (48 \frac{\text{ЕЭ}}{\text{доза}}). \quad (2)$$

Так как конкретные требования к качеству полисахаридных брюшнотифозных вакцин по показателю «Бактериальные эндотоксины» отсутствуют в ГФ РФ, в Европейской и Британской фармакопеях, в Фармакопее США¹⁹, то за норму ПС БЭ принято расчетное значение.

Расчет значения максимально допустимого разведения

Максимально допустимое разведение (МДР), рассчитывается по формуле (3)²⁰:

$$\text{МДР} = \frac{\text{ПС БЭ} \times \text{концентрация испытуемого раствора}}{\text{чувствительность ЛАЛ-реактива} (\lambda)}. \quad (3)$$

В данном исследовании использовались ЛАЛ-реактивы с чувствительностью 0,03 ЕЭ/мл. Соответственно, значение МДР составляет 3200.

Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива

Согласно требованиям ГФ РФ необходимым условием выполнения гель-тромб теста является проведение предварительных анализов: подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива и оценка наличия мешающих факторов²¹. Данные испытания можно рассматривать как валидационные процедуры [11]²². В первую очередь проводится процедура подтверждения заявленной чувствительности

¹³ ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики.

¹⁴ European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes № 123, 18.03.1986. Council of Europe; 1986. <https://rm.coe.int/168007a67b>

¹⁵ Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>

¹⁶ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹⁷ Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Вианвак® (Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная); Р N000183/01-070218. https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=51ab849d-8edb-4ef3-819a-2a9807b63a14

¹⁸ https://cdn.who.int/media/docs/default-source/child-growth/child-growth-standards/indicators/weight-for-age/sft-wfa-girls-z-0-5.pdf?sfvrsn=6606c085_11

¹⁹ ФС.3.3.1.0012.15 Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Monograph 1160. Typhoid polysaccharide vaccine. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2019.

Typhoid polysaccharide vaccine. British Pharmacopoeia; 2020.

USP 41-NF 39 <1234> Vaccines for human use—polysaccharide and glycoconjugate vaccines; 2021.

²⁰ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²¹ Там же.

²² Ситников АГ. Опыт «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива», его назначение и место в общей системе контрольных анализов. ЛАЛ-тест. 2006;(4):1–8.

ЛАЛ-реактива, которая является универсальным средством оценки работоспособности всей тест-системы и позволяет не только проверить качество используемых реактивов, но и провести аттестацию оборудования, подтвердить квалификацию аналитиков²³.

Чувствительность используемого в анализе ЛАЛ-реактива определяет наименьшее содержание эндотоксина, которое можно оценить с помощью гель-тромб теста [12]²⁴.

В ходе проведения исследований использовали реактивы двух производителей, полученные из амебоцитов мечехвостов двух видов – *Limulus* (ЛАЛ-реактив) и *Tachypleus* (ТАЛ-реактив). Согласно требованиям ГФ РФ²⁵ и других фармакопей²⁶ допускается использование обоих реактивов как взаимозаменяемых. По своим свойствам реактивы аналогичны, заявленная производителями чувствительность (λ) данных реактивов составляет 0,03 ЕЭ/мл, что позволяет использовать их для проведения гель-тромб теста.

Результаты подтверждения чувствительности пары ЛАЛ-реактив / контрольный стандарт эндотоксина (КСЭ) и ТАЛ-реактив / КСЭ представлены в *таблицах 1 и 2*.

Так как полученные в экспериментах значения чувствительности ЛАЛ-реактива (0,0357 и 0,0252 ЕЭ/мл) больше 0,5 λ и меньше 2 λ , заявленная чувствительность ЛАЛ-реактива считается подтвержденной. Вместе с тем показано, что соблюдены все необходимые условия проведения эксперимента.

Выбор рабочего разведения вакцины

С целью выбора рабочего разведения проведен ряд испытаний пяти серий брюшнотифозной вакцины. Определение рабочего разведения является одним из главных компонентов валидации методики определения БЭ. Выбор разведения основывается на результатах, полученных в ходе количественного анализа [13]. Рабочее разведение должно соответствовать следующим требованиям: в данном разведении препарат не содержит БЭ; разведение как можно меньше (как минимум в 2 раза меньше значения МДР); значение pH раствора находится в оптимальном диапазоне для проведения ЛАЛ-теста (6,0–8,0) [13].

В ходе исследований вначале был проведен анализ десятикратных разведений вакцины

Таблица 1. Результаты подтверждения заявленной чувствительности пары ЛАЛ-реактив / контрольный стандарт эндотоксина
Table 1. Confirmation of labelled sensitivity for the combination of LAL and CSE

| № повторности <i>Replicate No.</i> | Разведение КСЭ <i>CSE dilution</i> | | | | Отрицательный контроль <i>Negative control</i> | Конечная концентрация БЭ (C_{BE}), ЕЭ/мл <i>Final BE concentration (C_{BE}), EU/mL</i> | $\lg C_{BE}$ <i>log₁₀ C_{BE}</i> |
|---------------------------------------|--|--|--|---|---|--|--|
| | 2 λ 0,06 ЕЭ/мл <i>0.06 EU/mL</i> | λ 0,03 ЕЭ/мл <i>0.03 EU/mL</i> | 0,5 λ 0,015 ЕЭ/мл <i>0.015 EU/mL</i> | 0,25 λ 0,0075 ЕЭ/мл <i>0.0075 EU/mL</i> | | | |
| 1 | + | + | – | – | – | 0,030 | -1,5229 |
| 2 | + | + | – | – | | 0,030 | -1,5229 |
| 3 | + | – | – | – | – | 0,060 | -1,2218 |
| 4 | + | + | – | – | | 0,030 | -1,5229 |
| | | | | | | Среднее значение $\lg C_{BE}$ <i>Mean log₁₀ C_{BE}</i> -1,4476 | |
| | | | | | | ant $\lg C_{BE}$ (ср. геом. значение) 0,0357 ЕЭ/мл <i>ant log₁₀ C_{BE} (geometric mean)</i> 0,0357 EU/mL | |

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

Примечание. В качестве отрицательного контроля использовали воду для ЛАЛ-теста. ЛАЛ – лизат амебоцитов мечехвоста *Limulus*; КСЭ – контрольный стандарт эндотоксина; БЭ – бактериальные эндотоксины; «+» – положительная реакция (наличие геля); «–» – отрицательная реакция (отсутствие геля).

Note. LAL reagent water was used as the negative control. LAL, *Limulus* amoebocyte lysate; CSE, control standard endotoxin; BE, bacterial endotoxin; +, positive reaction (gel clot); –, negative reaction (no gel clot).

²³ Чиркова МН, Ситников АГ. Гель-тромб тест, чувствительность ЛАЛ-реактива и метода. ЛАЛ-тест. 2005;(3):1–4.

²⁴ Там же.

²⁵ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²⁶ Monograph 2.6.14. Bacterial endotoxins. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2019. USP 41–NF 39<85> Bacterial endotoxins test; 2021.

Таблица 2. Результаты подтверждения заявленной чувствительности пары ТАЛ-реактив / контрольный стандарт эндотоксина
Table 2. Confirmation of labelled sensitivity for the combination of TAL and CSE

| № повторности <i>Replicate No.</i> | Разведение КСЭ <i>CSE dilution</i> | | | | Отрицательный контроль <i>Negative control</i> | Конечная концентрация БЭ (C _{БЭ}), ЕЭ/мл <i>Final BE concentration (C_{BE}), EU/mL</i> | lg C _{БЭ} <i>log₁₀ C_{BE}</i> |
|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---|--|---|--|--|
| | 2Л 0,06 ЕЭ/мл <i>0.06 EU/mL</i> | Л 0,03 ЕЭ/мл <i>0.03 EU/mL</i> | 0,5Л 0,015 ЕЭ/мл <i>0.015 EU/mL</i> | 0,25Л 0,0075 ЕЭ/мл <i>0.0075 EU/mL</i> | | | |
| 1 | + | + | + | - | - | 0,015 | -1,8239 |
| 2 | + | + | - | - | | 0,030 | -1,5229 |
| 3 | + | + | - | - | | 0,030 | -1,5229 |
| 4 | + | + | - | - | | 0,030 | -1,5229 |
| | | | | | | Среднее значение lg C _{БЭ} <i>Mean log₁₀ C_{BE}</i> -1,5981 | |
| | | | | | | ant lg C _{БЭ} (ср. геом. значение) 0,0252 ЕЭ/мл <i>ant log₁₀ C_{BE} (geometric mean)</i> 0,0252 EU/mL | |

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

Примечание. В качестве отрицательного контроля использовали воду для ЛАЛ-теста. ТАЛ – лизат амебоцитов мечехвоста *Tachypleus*; КСЭ – контрольный стандарт эндотоксина; БЭ – бактериальные эндотоксины, «+» – положительная реакция (наличие геля); «-» – отрицательная реакция (отсутствие геля).

Note. LAL reagent water was used as the negative control. TAL, *Tachypleus* amoebocyte lysate; CSE, control standard endotoxin; BE, bacterial endotoxin; +, positive reaction (gel clot); -, negative reaction (no gel clot).

от 1/1 до 1/3200 (значение МДР), далее – двукратных разведений. В испытаниях использовали ЛАЛ-реактив и ТАЛ-реактив. Наряду с положительным и отрицательным контролями корректность результатов опыта также подтверждалась положительным контролем испытуемого образца (контроль ингибирования) – испытуемый препарат с КСЭ в концентрации 2Л. Положительные результаты в контроле ингибирования доказывают, что препарат не оказывает подавляющего действия на ход реакции.

При проведении анализа десятикратных разведений исследовали по одному образцу пяти серий лекарственного препарата. В данном ряду разведений для пяти испытуемых образцов конечной точкой реакции стало разведение 1/10. В соответствии с этим выбран интервал для постановки анализа двукратных разведений от 1/8 до 1/128.

При проведении анализа двукратных разведений исследовали по три образца пяти серий испытуемого препарата. Для каждого образца готовили ряд последовательных двукратных разведений от 1/8 до 1/128. Каждое разведение исследовалось в двух повторностях. Результаты представлены в *таблице 3*.

Установлено, что для 15 исследуемых образцов конечной точкой реакции стали разведения 1/32 и 1/16. Так как рабочее разведение должно

быть минимально возможным, но при этом иметь запас прочности – выбрано разведение 1/128. Значения pH растворов препарата в данном разведении для всех испытанных образцов входят в пределы 6,5–6,8.

Результаты проведенных испытаний показали, что средние геометрические значения концентраций БЭ находятся в диапазоне от 0,48 до 0,96 ЕЭ/мл, что соответствует содержанию БЭ в образцах испытуемого препарата от 0,24 до 0,48 ЕЭ/доза (0,5 мл).

Анализ наличия мешающих факторов

Анализ наличия в препарате мешающих факторов, способных подавлять и/или потенцировать реакцию лизата амебоцитов с БЭ, является следующим этапом валидации гель-тромб теста и определяет возможность испытания лекарственного препарата с помощью данного метода; проводится в соответствии с требованиями ГФ РФ²⁷.

Испытания на наличие мешающих факторов трех серий брюшнотифозной вакцины в рабочем разведении 1/128 проводились с использованием трех образцов каждой серии в четырех повторностях (*таблица 4*). В исследовании использовали ТАЛ-реактив.

Результаты проведенных испытаний показали, что реакция ТАЛ-реактива с эндотоксином

²⁷ ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Таблица 3. Результаты анализа двукратных разведений вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной при выборе рабочего разведения

Table 3. Test results for two-fold dilutions of the typhoid Vi polysaccharide vaccine obtained as part of selecting the working dilution

| № повторности <i>Replicate No.</i> | Разведение вакцины <i>Vaccine dilution</i> | | | $C_{БЭ}^*$ ЕЭ/мл C_{BE}^* EU/mL | $\lg C_{БЭ}$ $\log_{10} C_{BE}$ | $\Sigma \lg C_{БЭ}$ $\Sigma \log_{10} C_{BE}$ | $\Sigma \lg C_{БЭ}/n$ $\Sigma \log_{10} C_{BE}/n$ | $\text{ant } \Sigma \lg C_{БЭ}/n,$ ЕЭ/мл $\text{ant } \Sigma \log_{10} C_{BE}/n,$ EU/mL |
|---------------------------------------|---|------|-------------|--------------------------------------|------------------------------------|--|--|--|
| | $\leq 1/16$ | 1/32 | $\geq 1/64$ | | | | | |
| Серия № 1 <i>Batch 1</i> | | | | | | | | |
| Образец 1 <i>Sample 1</i> | | | | | | | | |
| 1 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | -0,6376 | -0,3188 | 0,4800 |
| 2 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | | | |
| Образец 2 <i>Sample 2</i> | | | | | | | | |
| 1 | + | + | - | 0,96 | -0,0177 | -0,3365 | -0,1682 | 0,6788 |
| 2 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | | | |
| Образец 3 <i>Sample 3</i> | | | | | | | | |
| 1 | + | + | - | 0,96 | -0,0177 | -0,3365 | -0,1682 | 0,6788 |
| 2 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | | | |
| Серия № 2 <i>Batch 2</i> | | | | | | | | |
| Образец 4 <i>Sample 4</i> | | | | | | | | |
| 1 | + | + | - | 0,96 | -0,0177 | -0,3365 | -0,1682 | 0,6788 |
| 2 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | | | |
| Образец 5 <i>Sample 5</i> | | | | | | | | |
| 1 | + | + | - | 0,96 | -0,0177 | -0,0354 | -0,0177 | 0,9600 |
| 2 | + | + | - | 0,96 | -0,0177 | | | |
| Образец 6 <i>Sample 6</i> | | | | | | | | |
| 1 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | -0,3365 | -0,1682 | 0,6788 |
| 2 | + | + | - | 0,96 | -0,0177 | | | |
| Серия № 3 <i>Batch 3</i> | | | | | | | | |
| Образец 7 <i>Sample 7</i> | | | | | | | | |
| 1 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | -0,6376 | -0,3188 | 0,4800 |
| 2 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | | | |
| Образец 8 <i>Sample 8</i> | | | | | | | | |
| 1 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | -0,6376 | -0,3188 | 0,4800 |
| 2 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | | | |
| Образец 9 <i>Sample 9</i> | | | | | | | | |
| 1 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | -0,6376 | -0,3188 | 0,4800 |
| 2 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | | | |

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

| № повторности Replicate No. | Разведение вакцины Vaccine dilution | | | $C_{БЭ}$, ЕЭ/мл C_{BE} , EU/mL | $\lg C_{БЭ}$ $\log_{10} C_{BE}$ | $\Sigma \lg C_{БЭ}$ $\Sigma \log_{10} C_{BE}$ | $\Sigma \lg C_{БЭ}/n$ $\Sigma \log_{10} C_{BE}/n$ | ant $\Sigma \lg C_{БЭ}/n$, ЕЭ/мл ant $\Sigma \log_{10} C_{BE}/n$, EU/mL |
|-----------------------------------|--|------|-------------|--------------------------------------|------------------------------------|--|--|--|
| | $\leq 1/16$ | 1/32 | $\geq 1/64$ | | | | | |
| Серия № 4 Batch 4 | | | | | | | | |
| Образец 10 Sample 10 | | | | | | | | |
| 1 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | -0,3365 | -0,1682 | 0,6800 |
| 2 | + | + | - | 0,96 | -0,0177 | | | |
| Образец 11 Sample 11 | | | | | | | | |
| 1 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | -0,3365 | -0,1682 | 0,6800 |
| 2 | + | + | - | 0,96 | -0,0177 | | | |
| Образец 12 Sample 12 | | | | | | | | |
| 1 | + | + | - | 0,96 | -0,0177 | -0,3365 | -0,1682 | 0,6800 |
| 2 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | | | |
| Серия № 5 Batch 5 | | | | | | | | |
| Образец 13 Sample 13 | | | | | | | | |
| 1 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | -0,6376 | -0,3188 | 0,4800 |
| 2 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | | | |
| Образец 14 Sample 14 | | | | | | | | |
| 1 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | -0,6376 | -0,3188 | 0,4800 |
| 2 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | | | |
| Образец 15 Sample 15 | | | | | | | | |
| 1 | + | + | - | 0,96 | -0,0177 | -0,3365 | -0,1682 | 0,6800 |
| 2 | + | - | - | 0,48 | -0,3188 | | | |

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

Примечание. БЭ – бактериальные эндотоксины; $C_{БЭ}$ – концентрация БЭ; n – число параллельных проб образцов серии препарата ($n=2$); «+» – положительная реакция (наличие геля); «-» – отрицательная реакция (отсутствие геля); серия № 1 – коммерческая серия № 400-0520; серия № 2 – коммерческая серия № 402-0620; серия № 3 – коммерческая серия № 414-0922; серия № 4 – коммерческая серия № 406-0621; серия № 5 – коммерческая серия № 413-0522.

Note. BE, bacterial endotoxins; C_{BE} , BE concentration; n , number of replicates for a vaccine batch ($n=2$); +, positive reaction (gel clot); -, negative reaction (no gel clot); Batch 1, commercial batch No. 400-0520; Batch 2, commercial batch No. 402-0620; Batch 3, commercial batch No. 414-0922; Batch 4, commercial batch No. 406-0621; Batch 5, commercial batch No. 413-0522.

для серийных разведений КСЭ в растворе испытуемой вакцины аналогична его реакции с БЭ для серийных разведений КСЭ в воде (положительный контроль). Во всех опытах было получено среднее геометрическое значение концентрации эндотоксина не менее 0,5 λ и не более 2 λ , то есть результат эксперимента удовлетворяет требованиям данного теста. В пробах с отрицательными контролями (вода для ЛАЛ-теста

и вакцина в рабочем разведении) зафиксировано отсутствие гелеобразования, что подтверждает корректность полученных результатов.

На основании полученных результатов определено, что исследуемые образцы вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной в рабочем разведении 1/128 не содержат мешающих факторов. Установленное рабочее разведение 1/128 в 25 раз меньше значения МДР.

Таблица 4. Результаты определения наличия мешающих факторов в вакцине брюшнотифозной Ви-полисахаридной
Table 4. Results of testing the typhoid Vi polysaccharide vaccine for interfering factors

| № повторности <i>Replicate No.</i> | Разведение КСЭ <i>CSE dilution</i> | | | | $C_{БЭ}$ ЕЭ/мл <i>C_{BE} EU/mL</i> | Среднее геометрическое значение $C_{БЭ}$, ЕЭ/мл <i>Geometric mean C_{BE} EU/mL</i> |
|--|---------------------------------------|--------------------------------------|---|--|---|--|
| | 2λ 0,06 ЕЭ/мл <i>0.06 EU/mL</i> | λ 0,03 ЕЭ/мл <i>0.03 EU/mL</i> | 0,5λ 0,015 ЕЭ/мл <i>0.015 EU/mL</i> | 0,25λ 0,0075 ЕЭ/мл <i>0.0075 EU/mL</i> | | |
| Положительный контроль (вода для ЛАЛ-теста + КСЭ) <i>Positive control (LAL reagent water + CSE)</i> | | | | | | |
| 1 | + | + | - | - | 0,030 | 0,0300 |
| 2 | + | + | - | - | 0,030 | |
| Вакцина в разведении 1/128 + КСЭ <i>1/128 vaccine dilution + CSE</i> | | | | | | |
| Серия № 3, образец 1 <i>Batch 3, sample 1</i> | | | | | | |
| 1 | + | - | - | - | 0,060 | 0,0300 |
| 2 | + | + | - | - | 0,030 | |
| 3 | + | + | - | - | 0,030 | |
| 4 | + | + | + | - | 0,015 | |
| Серия № 3, образец 2 <i>Batch 3, sample 2</i> | | | | | | |
| 1 | + | + | - | - | 0,030 | 0,0212 |
| 2 | + | + | - | - | 0,030 | |
| 3 | + | + | + | - | 0,015 | |
| 4 | + | + | + | - | 0,015 | |
| Серия № 3, образец 3 <i>Batch 3, sample 3</i> | | | | | | |
| 1 | + | + | + | - | 0,015 | 0,0150 |
| 2 | + | + | + | - | 0,015 | |
| 3 | + | + | + | - | 0,015 | |
| 4 | + | + | + | - | 0,015 | |
| Серия № 4, образец 1 <i>Batch 4, sample 1</i> | | | | | | |
| 1 | + | + | - | - | 0,030 | 0,0212 |
| 2 | + | + | + | - | 0,015 | |
| 3 | + | + | - | - | 0,030 | |
| 4 | + | + | + | - | 0,015 | |
| Серия № 4, образец 2 <i>Batch 4, sample 2</i> | | | | | | |
| 1 | + | + | - | - | 0,030 | 0,0300 |
| 2 | + | + | - | - | 0,030 | |
| 3 | + | + | - | - | 0,030 | |
| 4 | + | + | - | - | 0,030 | |
| Серия № 4, образец 3 <i>Batch 4, sample 3</i> | | | | | | |
| 1 | + | + | - | - | 0,030 | 0,0252 |
| 2 | + | + | - | - | 0,030 | |

Продолжение таблицы 4
Table 4 (continued)

| № повторности Replicate No. | Разведение КСЭ CSE dilution | | | | C _{БЭ} , ЕЭ/мл C _{BE} EU/mL | Среднее геометрическое значение C _{БЭ} , ЕЭ/мл Geometric mean C _{BE} EU/mL |
|---|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|--|---|
| | 2λ 0,06 ЕЭ/мл 0.06 EU/mL | λ 0,03 ЕЭ/мл 0.03 EU/mL | 0,5λ 0,015 ЕЭ/мл 0.015 EU/mL | 0,25λ 0,0075 ЕЭ/мл 0.0075 EU/mL | | |
| 3 | + | + | - | - | 0,030 | 0,0252 |
| 4 | + | + | + | - | 0,015 | |
| Серия № 5, образец 1 Batch 5, sample 1 | | | | | | |
| 1 | + | + | - | - | 0,030 | 0,0357 |
| 2 | + | + | - | - | 0,030 | |
| 3 | + | + | - | - | 0,030 | |
| 4 | + | - | - | - | 0,060 | |
| Серия № 5, образец 2 Batch 5, sample 2 | | | | | | |
| 1 | + | + | - | - | 0,030 | 0,0300 |
| 2 | + | + | - | - | 0,030 | |
| 3 | + | + | - | - | 0,030 | |
| 4 | + | + | - | - | 0,030 | |
| Серия № 5, образец 3 Batch 5, sample 3 | | | | | | |
| 1 | + | + | + | - | 0,015 | 0,0178 |
| 2 | + | + | + | - | 0,015 | |
| 3 | + | + | + | - | 0,015 | |
| 4 | + | + | - | - | 0,030 | |

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

Примечание. КСЭ – контрольный стандарт эндотоксина; БЭ – бактериальные эндотоксины; C_{БЭ} – концентрация БЭ; «+» – положительная реакция (наличие геля); «-» – отрицательная реакция (отсутствие геля); серия № 3 – коммерческая серия № 414-0922; серия № 4 – коммерческая серия № 406-0621; серия № 5 – коммерческая серия № 413-0522.

Note. CSE, control standard endotoxin; BE, bacterial endotoxins; C_{BE}, BE concentration; +, positive reaction (gel clot); -, negative reaction (no gel clot); Batch 3, commercial batch No. 414-0922; Batch 4, commercial batch No. 406-0621; Batch 5, commercial batch No. 413-0522

Оценка пирогенности брюшнотифозной вакцины биологическим методом

В тесте на пирогенность *in vivo* проанализированы образцы пяти серий исследуемой вакцины в разведениях, близких к рабочему, определенному по результатам ЛАЛ-теста: от 1/16 до 1/256 (таблица 5). В соответствии с ГФ РФ²⁸ для каждой анализируемой концентрации лекарственного средства тест на пирогенность проводили на трех кроликах. Тест-доза составляла 1 мл на 1 кг веса животного.

Как видно из таблицы 5, при введении животным брюшнотифозной вакцины серий № 1 и 2 в разведениях 1/16 и 1/32 наблюдалось

общее повышение температуры на 2,0–2,3 и на 1,8–2,1 °С соответственно, что согласно ГФ РФ²⁹ является пирогенной реакцией. Исследование препарата в разведениях 1/64 и 1/128 пирогенной реакции не выявило: $\Sigma\Delta T_{\max}$ находилась в пределах 0,6–0,8 °С, $\Delta T_{\max} \leq 0,5$ °С.

Введение вакцины серий № 3 и 4 в разведениях 1/64 и 1/128 вызывало пирогенное действие: $\Sigma\Delta T_{\max} > 1,2$ °С с индивидуальными повышениями температуры на 0,1–1,3 °С. При введении препарата этих серий в разведении 1/256 пирогенная реакция не наблюдалась: $\Sigma\Delta T_{\max}$ находилась в пределах 0,9–1,0 °С, $\Delta T_{\max} < 0,5$ °С.

²⁸ ОФС.1.2.4.0005.15 Пирогенность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

²⁹ Там же.

Таблица 5. Результаты испытания на пирогенность вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной
Table 5. Pyrogen test results for the typhoid Vi polysaccharide vaccine

| Разведение вакцины <i>Vaccine dilution</i> | Индивидуальное максимальное повышение температуры (ΔT_{\max}), °C <i>Maximum individual temperature rise (ΔT_{\max}), °C</i> | | | Сумма индивидуальных максимальных повышений температуры ($\Sigma \Delta T_{\max}$), °C <i>Sum of individual temperature rises ($\Sigma \Delta T_{\max}$), °C</i> |
|---|--|-----|-----|--|
| Серия № 1 <i>Batch 1</i> | | | | |
| 1/16 | 0,8 | 0,7 | 0,5 | 2,0 |
| 1/32 | 0,9 | 0,5 | 0,7 | 2,1 |
| 1/64 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,8 |
| 1/128 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,8 |
| Серия № 2 <i>Batch 2</i> | | | | |
| 1/16 | 0,6 | 0,8 | 0,9 | 2,3 |
| 1/32 | 0,5 | 0,7 | 0,6 | 1,8 |
| 1/64 | 0,1 | 0,5 | 0,2 | 0,8 |
| 1/128 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,6 |
| Серия № 3 <i>Batch 3</i> | | | | |
| 1/64 | 1,3 | 0,3 | 1,2 | 2,8 |
| 1/128 | 0,7 | 0,6 | 0,3 | 1,6 |
| 1/256 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 1,0 |
| Серия № 4 <i>Batch 4</i> | | | | |
| 1/64 | 0,1 | 0,6 | 0,7 | 1,4 |
| 1/128 | 0,3 | 0,4 | 0,6 | 1,3 |
| 1/256 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,9 |
| Серия № 5 <i>Batch 5</i> | | | | |
| 1/64 | 0,3 | 0,7 | 0,8 | 1,8 |
| 1/128 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 1,1 |
| 1/256 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 1,0 |

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

Примечание. Серия № 1 – коммерческая серия № 400-0520; серия № 2 – коммерческая серия № 402-0620; серия № 3 – коммерческая серия № 414-0922; серия № 4 – коммерческая серия № 406-0621; серия № 5 – коммерческая серия № 413-0522.
Note. Batch 1, commercial batch No. 400-0520; Batch 2, commercial batch No. 402-0620; Batch 3, commercial batch No. 414-0922; Batch 4, commercial batch No. 406-0621; Batch 5, commercial batch No. 413-0522.

При проведении испытаний препарата серии № 5 в разведении 1/64 отмечалось общее повышение температуры на 1,8 °C с индивидуальными повышениями температуры на 0,3–0,8 °C, что является пирогенной реакцией. При исследовании образцов в разведении 1/128 и 1/256 пирогенной реакции выявлено не было: отмечено общее повышение температуры на 1,1 и 1,0 °C, соответственно, $\Delta T_{\max} < 0,5$ °C.

Таким образом, минимальными разведениями препарата, при введении которых пирогенная реакция у животных отсутствовала, являются

разведения: для серий № 1 и 2 – 1/64; для серий № 3 и 4 – 1/256; серии № 5 – 1/128.

Сравнительный анализ данных, полученных при исследовании вакцины с помощью ЛАЛ-теста и в испытании на пирогенность *in vivo*

При испытании пяти серий вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной с помощью гель-тромб теста был получен положительный результат в разведениях 1/16 и 1/32, а отрицательный – в разведениях 1/64 и более. Результаты испытаний на пирогенность

показали, что введение вакцины в разведениях 1/16 и 1/32 во всех опытах вызывало пирогенную реакцию у кроликов, введение вакцины в разведениях 1/64 и 1/128 вызывало пирогенную реакцию в трех и в двух опытах из пяти соответственно, а при введении вакцины в разведении 1/256 пирогенная реакция отсутствовала во всех экспериментах. Наличие пирогенной реакции при введении препарата в разведениях 1/64 и 1/128, в которых показано отсутствие БЭ, вероятно, связано с наличием в препарате других пирогенных примесей, также возможно, что высокая вариабельность результатов вызвана различиями в индивидуальных реакциях лабораторных животных на введение препарата.

Выводы

1. Экспериментально доказана возможность оценки содержания бактериальных эндотоксинов в вакцине брюшнотифозной Ви-полисахаридной с помощью гель-тромб теста.
2. Установлены и обоснованы нормативные требования к качеству вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной по показателю «Бактериальные эндотоксины»: предельное содержание бактериальных эндотоксинов не более 48 ЕЭ/доза. Для проведения анализа препарат разводят водой для ЛАЛ-теста не менее чем в 256 раз.

Литература/References

1. Gorman A, Golovanov AP. Lipopolysaccharide structure and the phenomenon of low endotoxin recovery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2022;180:289–307. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.10.006>
2. Kim JH, Jung K, Kim J, Lee J, Kim H, Song H, et al. Development of a rabbit monocyte activation test as an alternative to the rabbit pyrogen test and its application in the analysis of plasma-derived products. *Biologicals.* 2021;71:20–30. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2021.04.003>
3. Fennrich S, Hennig U, Toliashvili L, Schlensak C, Wendwl HP, Stoppelkamp S. More than 70 years of pyrogen detection: current state and future perspectives. *Altern Lab Anim.* 2016;44(3):239–53. <https://doi.org/10.1177/026119291604400>
4. Bu R, Deng X, Cao Y, Jin J, Mai B, Meng K, et al. Effect of different sample treatment methods on Low Endotoxin Recovery phenomenon. *J Microbiol Methods.* 2021;186:106241. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106241>
5. Spoladore J, Gimenes I, Bachinski R, Negherbon JP, Hartung T, Granjeiro JM, et al. Standardized pyrogen testing of medical products with the bacterial endotoxin test (BET) as a substitute for rabbit pyrogen testing (RPT): a scoping review.

3. Выявлено, что испытуемый препарат в рабочем разведении 1/128 не содержит мешающих факторов, способных подавлять и/или потенцировать реакцию лизата амебоцитов с бактериальными эндотоксинами. Рабочее разведение в 25 раз меньше значения максимально допустимого разведения.
4. Результаты проведенных испытаний продемонстрировали, что качество образцов пяти разных серий испытуемой вакцины (2020–2022 гг. выпуска) соответствует установленным нормативным требованиям. Полученные значения содержания бактериальных эндотоксинов в исследуемых образцах находятся в диапазоне от 0,24 до 0,48 ЕЭ/доза, что значительно меньше предельного содержания (48 ЕЭ/доза).
5. Сравнительный анализ данных гель-тромб теста (Метод В) и теста на пирогенность показал, что при испытании пяти серий вакцины брюшнотифозной Ви-полисахаридной в разведении 1/256 пирогенная реакция отсутствует как *in vitro*, так и *in vivo*, что позволяет использовать данное разведение при проведении рутинных испытаний.
6. На основании полученных результатов рекомендовано введение показателя «Бактериальные эндотоксины» в Государственную фармакопею Российской Федерации ФС.3.3.1.0012.15 «Вакцина брюшнотифозная Ви-полисахаридная».

Toxicol in Vitro. 2021;74:105160.

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105160>

6. Novitsky TJ. BET vs. PT non-endotoxin pyrogens. *LAL Update.* 2002;20(2):1–4.
7. Boucher PE. A framework for evaluating nonclinical safety of novel adjuvants and adjuvanted preventive vaccines. In: Schijns VEJC, O'Hagan DT, eds. *Immunopotentiators in Modern Vaccines.* 2nd ed. Fort Washington, PA: Academic Press; 2017. P. 445–76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804019-5.00022-0>
8. Неугодова НП, Рябцева МС, Сапожникова ГА. Основные требования к биологическим показателям при оценке качества лекарственных средств. Возможности валидации биологических методов контроля. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2016;(3):3–8. Neugodova NP, Ryabtseva MS, Sapozhnikova GA. Basic requirements for biological criteria in drug quality evaluation. Validation of biological control methods. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2016;(3):3–8 (In Russ.). EDN: [WKNSOZ](https://www.edn.ru/WKNSOZ)
9. Fingola FF, Albertino SRG, de Abrantes SMP, Zamith HPS. Proposed reduction of the *in vivo* pyrogen test by the *in vitro* LAL assay for the quality

- control of anticrotalic, antiscorpion, antirabies and antitetanus sera. *Toxicol in Vitro*. 2019;59:292–9. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.04.031>
10. Шаповалова ОВ, Неугодова НП, Сапожникова ГА. Выбор метода определения бактериальных эндотоксинов. *Антибиотики и химиотерапия*. 2018;63(5–6):43–5. Shapovalova OV, Neugodova NP, Sapozhnikova GA. Choosing bacterial endotoxin detection method. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2018;63(5–6):43–5 (In Russ.). EDN: [XVVINE](#)
 11. Burguet N, Brito LC. Validación del método LAL para determinar endotoxinas bacterianas en el inyectable heparina sódica. *VaccciMonitor*. 2012;21(3):32–6 (In Span).
 12. Dawson ME. Preliminary testing. *LAL Update*. 1996;14(1):1–4.
 13. Шаповалова ОВ, Неугодова НП, Долгова ГВ, Сапожникова ГА. Методические подходы к разработке показателя «Бактериальные эндотоксины» в фармацевтических субстанциях. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2012;(2):47–50. Shapovalova OV, Neugodova NP, Dolgova GV, Sapozhnikova GA. Methodological approaches to the elaboration of “Bacterial endotoxins” index in the pharmaceutical substances. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2012;(2):47–50 (In Russ.). EDN: [RWVTUZ](#)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **М.В. Абрамцева** – разработка дизайна экспериментального исследования; анализ и обобщение литературных данных; анализ и систематизация экспериментальных данных; формулирование выводов; написание и редактирование текста рукописи; утверждение окончательной версии статьи для публикации; **Н.С. Алехина** – сбор, анализ и систематизация литературных данных; проведение инструментальных исследований (ЛАЛ-тест), пробоподготовка образцов; анализ и систематизация экспериментальных данных; оценка воспроизводимости результатов; оформление рукописи; **Е.Д. Кольшикина** – сбор, анализ и систематизация литературных данных; проведение инструментальных исследований (тест на пирогенность), пробоподготовка образцов; анализ и систематизация экспериментальных данных; оценка воспроизводимости результатов; оформление рукописи.

Соответствие принципам этики. Исследования на животных проводили в соответствии с правилами Европейской Конвенции ETS № 123 и директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/EU. Публикация научной статьи была одобрена на заседании локального этического комитета ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (протокол заседания № 3 от 26.09.2023).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **M.V. Abramtseva** designed the experimental study, analysed and summarised literature data, analysed and collated experimental data, formulated the conclusions, drafted and edited the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication. **N.S. Alekhina** collected, analysed, and collated literature data; conducted experiments (LAL tests); prepared samples; analysed and collated experimental data; assessed the results for reproducibility; and formatted the manuscript. **E.D. Kolyshkina** collected, analysed, and collated literature data; conducted experiments (rabbit pyrogen tests); prepared samples; analysed and collated experimental data; assessed the results for reproducibility; and formatted the manuscript.

Ethics approval. All the experiments in animals were performed according to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS No. 123) and Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council. The Local Bioethics Committee at the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products approved publishing this research paper under meeting minutes No. 3 dated 23 September 2023.

Об авторах / Authors

Абрамцева Марина Витальевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0714-1303>

Abramtceva@expmed.ru

Алехина Наталья Сергеевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1583-4887>

NAlekhina@expmed.ru

Кольшикина Елена Дмитриевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4976-483X>

kolyshkina@expmed.ru

Поступила 21.09.2023

После доработки 01.11.2023

Принята к публикации 24.11.2023

Marina V. Abramtseva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0714-1303>

Abramtceva@expmed.ru

Natalya S. Alekhina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1583-4887>

NAlekhina@expmed.ru

Elena D. Kolyshkina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4976-483X>

kolyshkina@expmed.ru

Received 21 September 2023

Revised 1 November 2023

Accepted 24 November 2023