

УДК: 579.871.1:612.118.22:612.08

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ БЕЗПЕЧНОСТІ ДИФТЕРІЙНОЇ ВАКЦИНИ

Ісаєнко О. Ю., Бабич С. М., Єлисеєва І. В.,
Ждамарова Л. А.,
Білозерський В. І., Колпак С.А.

В боротьбі з інфекційними хворобами вакцинопрофілактика, дієвість якої підтверджено часом, займає провідне місце. Вакцинація здатна попередити такі важкі захворювання як дифтерія, гепатит В, кір, кашлюк, пневмонія, поліомієліт, ротавірусна діарея, краснуха, правець, тощо [1]. Згідно статистичних даних, імунізація кожний рік попереджує від 2 до 3 мільйонів летальних випадків від дифтерії, правця, кашлюку та корі [1]. І хоча протягом останніх років глобальне охоплення вакцинацією дітей, які отримують рекомендовані вакцини, не збільшується, а залишається на одному рівні, масова імунопрофілактика продовжує забезпечувати зазначені результати. У 2014 році в світі 18,7 мільйонів дітей грудного віку не було вакциновано проти дифтерії, правця та поліомієліту, більш 60 % із яких, мешкають у Демократичній Республіці Конго, Індії, Індонезії, Іраку, Нігерії, Пакистані, Уганді, Філіппінах, Ефіопії, Південній Африці, Україні котрі є ендемічними з багатьох інфекційних захворювань [1]. Збільшення рівня імунопрофілактики населення дасть можливість ефективно контролювати інфекційні захворювання та позбавити населення великих регіонів світу від багатьох хвороб [1 - 21].

Успіхи вакцинопрофілактики залежать не лише від повного та своєчасного охоплення щепленнями загрозливих контингентів, а й від якості вакцин. Статистичні дані ВООЗ (Всесвітньої організації охорони здоров'я) свідчать: летальність від побічної дії лікарських засобів, займає п'яте місце в світі [21]. Технологія створення будь-якого вакцинного препарату передбачає перевірку його на безпечність: токсичність, пірогенність, стерильність, алергенність, тератогенність, мутагенність та імуногенність. Перевірку профілактичних засобів, призначених для імунізації людей, здійснюють переважно на лабораторних тваринах. Оскільки, практично всі вакцинні препарати застосовують для дітей, а деякі імунопрофілактичні засоби, такі як кашлюково-дифтерійно-правцева вакцина (АКДП) – для немовлят, методам контролю безпечності вакцин приділяється велика увага, збільшуються вимоги до гарантій безпечності вакцинних препаратів [3].

В деяких країнах національні вимоги контролю вакцинних препаратів відрізняються від міжнародних. Для проведення швидкої, надійної та незалежної наукової оцінки аспектів безпечності вакцин ВООЗ у 1999 році створила Глобальний консультативний комітет по безпечності вакцин. Комітет займається детальним вивченням останніх даних про вакцини, оцінкою даних про взаємозв'язок вакцин та/або їх компонентів і можливих їх побічних реакцій, при необхідності створення спеціальних оперативних груп для призначення, моніторингу і оцінки досліджень

взаємозв'язку конкретних вакцин/компонентів та їх побічних реакцій [6]. Свої висновки та рекомендації Комітет публікує в Щотижневому Епідеміологічному Бюлетені ВООЗ (Weekly Epidemiological Record - WER) і на веб-сайті Комітету (http://www.who.int/vaccine_safety/en).

Для посилення потенціалу фармацевтичного надзору за якістю вакцин у 2012 році було створено Глобальну ініціативу по безпечності вакцин (ГІБВ). Вона передбачає виконання Глобальної програми по безпечності вакцин по напрямкам: підтримка усіх країн для проведення заходів в сфері безпечності вакцин; посилення оцінки безпечності вакцин в країнах, де вводяться нові вакцини, які поступили на ринок, і в країнах, де випускаються та використовуються імунопрофілактичні препарати, які пройшли попередню кваліфікацію; підтримка країн на міжнародному рівні завдяки проведенню учбових заходів та обміну інформацією. Всім зацікавленим в забезпеченні безпечності вакцин, пропонують прийняти участь у діяльності ГІБВ з урахуванням їх досвіду та відповідних інтересів [2].

Вся продукція, яка випускається фармацевтичною промисловістю, незалежно від форм їх власності, повинна відповідати певним стандартам якості, які регламентуються у національній Державній Фармакопеї. При визначенні напрямку розвитку фармацевтичного сектору галузі охорони здоров'я України в 90-х роках ХХ століття було запропоновано два варіанти прийняття системи стандартів: за стандартами Всесвітньої організації охорони здоров'я та за стандартами Європейського Союзу (ЄС). Згідно результатів аналізу законодавчої та нормативної бази ЄС, нормативних документів ВООЗ, ІСН (Міжнародної конференції з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських препаратів для людини), РІС (Конвенції фармацевтичних інспекцій) та РІС/С (Системи співробітництва фармацевтичних інспекцій), представлених у рамках програми ТАСІС, для України є перспективним прийняття системи європейських нормативних документів, а не системи документів ВООЗ, призначених для країн, що розвиваються [4, 12].

Прийняття Закону України «Про Концепцію Загальнодержавної програми адаптації законодавства України до законодавства Європейського Союзу» показало, що Закони України є, і в подальшому будуть, гармонізовані з документами та директивами Європейського Союзу [4].

Одним із основних принципів, покладених в основу Державної Фармакопеї України, є рівень вимог до лікарських засобів, прийнятий у рамках Міждержавної комісії зі стандартизації, реєстрації і контролю лікарських засобів, виробів медичного призначення і медичної техніки держав-учасниць СНД (Співдружність Незалежних Держав), що дає можливість вітчизняним підприємствам експортувати свою продукцію в країни СНД. Схема побудови загальних статей і монографій Державної Фармакопеї України представлена двома взаємозалежними частинами – європейською, яка ідентична до відповідного матеріалу Європейської Фармакопеї, та національною (позначена літерою "N" в кінці статті), яка враховує специфіку сучасного стану

фармацевтичного виробництва України: вона не суперечить європейській, а включає додаткові випробування, інформаційні матеріали та альтернативні методики. Отже Державна Фармакопея України дає можливість виробникам випускати препарати, які відповідають Європейським стандартам, контролюючим органам – перевіряти їх у відповідності з Європейськими стандартами, експертним органам – проводити перевірку відповідно до Європейських вимог.

Завдяки введенню 4-го Доповнення до Державної Фармакопеї України здійснено не лише його гармонізування з європейськими вимогами, а й посилено контроль якості вакцинних засобів. Слід зазначити, що національні вимоги до виробництва імунопрофілактичних препаратів є жорсткішими в порівнянні з іншими країнами [16, 17].

При розробці та впровадженні нових лікарських засобів в Україні важливе місце також відводиться клінічним випробуванням. Існуюча на даний час нормативно-правова база України щодо клінічних випробувань лікарських засобів повністю відповідає кращим міжнародним підходам та директивам Європейського Союзу, про що неодноразово засвідчували експерти ВООЗ, представники ЕМА (European Medicines Agency – Європейської агенції з ліків) та FDA (Food and Drug Administration – агенції з ліків в США). А проведення клінічних випробувань за участю дітей, на даний час, згідно законодавству України, більш регламентоване та суворіше навіть у порівнянні з країнами Європи, що є вагомим досягненням української фармацевтичної промисловості [23].

Згідно даних «British Union for the Abolition of Vivisection (BUAV) та «Nuffield Council on Bioethics», кожний рік в світі понад 100 мільйонів тварин задіяні в експериментах, серед цих тестів є й перевірка безпечності вакцинних препаратів [8]. Результати дослідів на тваринах є недостовірними через причинення їм болю зазначив Едмунд О'міру ще в 1655 році [9]. Тільки в США кожний рік від реакцій на препарати гине 100 000 людей: лікарські засоби, які за результатами тестів на тваринах були сертифіковані як нешкідливі, у людей викликають побічні явища та смерть [8]. Згідно різним даним, при визначенні токсичності, кореляція побічних реакцій між людьми та тваринами знаходиться в діапазоні 1–25 %, тобто дослідження на тваринах дозволяють виявити максимум одне із чотирьох побічних явищ, які згодом з'являться у людини. У тварин неможливо простежити нудоту, запаморочення, головні болі, порушення зору і спрогнозувати довготривалі побічні явища через коротке, до 66 разів, життя лабораторних тварин у порівнянні з людьми [8].

Пошуком альтернативних методів визначення токсичності без використання лабораторних тварин займаються здавна. Ще в 1959 році Russell та Burch була запропонована концепція «3R»: «refinement» – поліпшення вимог утримування та поводження з тваринами; «reduction» – зменшення їх кількості; «replacement» – заміна високоорганізованих тварин низькоорганізованими та використання альтернативних методів [10].

В європейському законодавстві концепція «3R» явно не згадується, але її принципи включено до статті 7, параграфу 2-4 Директиви Європейського Економічного Співтовариства 86/609/ЄЕС (1986) [8]. У вересні 2010 року Європейським парламентом було прийнято нову директиву 2010/63/ЄС, яка замінила попередню 86/609/ЄЕС.

В перерахованих документах, а також в Гельсінкській декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (2000 р.), рекомендаціях 1985 р. етичного кодексу розділу «Міжнародні рекомендації по проведенню медико-біологічних досліджень з використанням тварин», в Законі України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV 2006 року, пропонують застосування тварин замінити на альтернативні способи. В пріоритеті значаться методи контролю біопрепаратів без використання лабораторних тварин: тестування на тканинних та клітинних культурах бактерій, математичне моделювання, комп'ютерні технології [8-10].

Дифтерійна вакцина – анатоксин – становить собою повністю незаражений дифтерійний екзотоксин, який володіє високою імуногенністю (доза препарату, яка захищає 50 % імунізованих тварин).

Для одержання дифтерійного токсину використовують токсигенний штам *Corynebacterium diphtheriae*, депонований у Державній колекції. Якість рідких живильних середовищ для культивування мікробних клітин повинна забезпечувати високу продукцію дифтерійного токсину та зберігання властивостей штаму. Для виробництва дифтерійного анатоксину використовують культуральне середовище, з активністю токсину не менш як 80 Lf в 1 мл.

Детоксикація токсину, котра здійснюється хімічними та/або фізичними методами, повинна забезпечити зберігання його антигенної активності і гарантувати відсутність реверсії токсичних властивостей та відсутність залишкової токсичності (специфічна безпечність).

Анатоксин має бути максимально очищений від баластних домішок методами, що забезпечують зберігання його антигенних властивостей. Для підвищення імуногенності дифтерійний анатоксин адсорбують на ад'юванті алюмінію гідроксиді. Кількість анатоксину в одиниці об'єму або у прищеплювальній дозі виражають у одиницях маси або в установлених Міжнародних одиницях (флокулюючі одиниці – Lf, одиниці зв'язування – ОЗ, тощо). Специфічну (імуногенну) активність дифтерійного анатоксину у складі адсорбованих вакцин виражають у МО (міжнародні одиниці).

Виробництво дифтерійної вакцини передбачає отримання максимальної кількості дифтерійного токсину в період фази росту *C. diphtheriae* та переведення токсину в стабільний анатоксин. Контроль безпечності протидифтерійних препаратів, згідно рекомендаціям ВООЗ, включає наступні етапи:

- 1) вивчення безпечності об'єданого очищеного анатоксину;
- 2) визначення відсутності дифтерійного токсину в розведеннях очищеного анатоксину;
- 3) вивчення специфічної токсичності готової вакцинної маси;

4) перевірка нешкідливості готового продукту (готової серії).

Об'єднаний очищений анатоксин – оброблений очищений матеріал із одного або декількох разових зборів – є вихідним матеріалом для отримання готової вакцинної маси.

Об'єднаний очищений анатоксин перевіряють на відсутність дифтерійного токсину. Специфічну безпечність визначають підшкірним методом зараження п'яток чи більшої кількості мурчаків вагою 250–350 г., яким підшкірно вводять очищений анатоксин, в розведенні, в якому міститься не менш як 500 Lf анатоксину. За тваринами спостерігають впродовж 6 тижнів: відсутність ознак специфічної інтоксикації, втрата ваги тіла, шкірних виразок, інфільтратів, абсцесів, некрозів у місцях ін'єкцій у жодної тварини, та виживаність не менш 80 % свідчить про відсутність дифтерійного токсину в тестованому матеріалі [7]. Якщо досліджуваний препарат містить токсин, тварина гине, розтин зазначеного мурчака виявляє симптоми дифтерійної інтоксикації: збільшення та почервоніння надниркових залоз.

Додатково деякі виробники використовують внутрішньошкірний метод визначення присутності дифтерійного токсину в кожному об'єднаному очищеному анатоксині. Зараження проводять на кролях або мурчаках, яким вводять не менш 20 Lf очищеного анатоксину [7]. Позитивна реакція токсичності матеріалу, що перевіряється, – це наявність специфічної еритеми в місці введення препарату. Незважаючи на те, що внутрішньошкірний метод визначення присутності дифтерійного токсину менш точний, ніж підшкірний, у переважній більшості випадків він є цілком надійним [18].

Можна також проводити визначення специфічної токсичності анатоксину на культурі клітин за умови затвердження національним органом контролю та показаній чутливості не нижчої, ніж при проведених дослідів на мурчаках. В багатьох країнах, які виробляють вакцинні засоби, при титруванні та визначенні біологічної активності дифтерійного токсину, анатоксину, лабораторні тварини замінено на культури клітин [20]. На сьогоднішній день тестів на наявність дифтерійного токсину за допомогою культур клітин існує велика кількість. В основі цих методів лежить цитопатична дія дифтерійного токсину на чутливі до нього культури клітин: клітини нирки африканських зелених мавп, культура клітин яєчників хом'яка, тощо [14, 18].

Щоб виключити можливість відновлення токсичності впродовж зберігання анатоксину, кожний об'єднаний очищений анатоксин необхідно розвести до тієї його концентрації, яка використовується в готовій вакцинній масі (готовій гомогенній вакцині, яка міститься в одному сосуді), при цьому, концентрація хімічних речовин повинна відповідати концентрації готової вакцинної маси (без ад'юванта) та витримати впродовж 6 тижнів при 37 °С. В деяких країнах розведений очищений анатоксин витримують при 34 °С, ВООЗ пропонує, в якості додаткового контролю, розведений очищений анатоксин витримувати ще й при 2–8 °С. А потім вже визначати наявність дифтерійного токсину.

Оскільки в розведеному очищеному анатоксині дифтерійного токсину не повинно бути зовсім, методи його визначення в цьому препараті повинні відзначатися високою чутливістю, щоб бути спроможними виявити навіть незначну кількість токсину. ВООЗ пропонує для цього використовувати внутрішньошкірний метод на мурчаках та тести за допомогою культур клітин [7].

Наступним етапом тестування є визначення специфічної токсичності готової вакцинної маси (готової гомогенної вакцини, яка міститься в одному сосуді) шляхом підшкірного зараження п'яток або більше мурчаків вагою 250–350 г., яким вводять препарат у кількості, відповідній не менш, ніж п'яти людським дозам. Відсутність специфічної інтоксикації у жодної тварини та виживання не менш 80 % впродовж 6 тижнів свідчить про відсутність дифтерійного токсину в готовій вакцинній масі. В разі загибелі тварини, її обов'язково досліджують на наявність симптомів дифтерійної інтоксикації – гіперемія та збільшення надниркових залоз.

Наступним етапом перевірки нешкідливості дифтерійного анатоксину є визначення підвищеної токсичності готового продукту (готової серії), набору запаяних ампул, які були розлиті з одного посуду впродовж однієї безперервної робочої зміни, тобто в однакових умовах в момент розливу.

Кожна готова серія підлягає перевірці на відсутність підвищеної токсичності за допомогою тестів, затверджених національним органом контролю. Підвищену токсичність готового продукту визначають внутрішньобрюшинним введенням п'яти мишам, вагою 17–22 г. та двом мурчакам вагою 250–350 г. по одній людській дозі кожній, в кількості не більше 1 мл. Відсутність загиблих тварин протягом 7 днів та відсутність виражених ознак токсикозу свідчить про безпечність готової серії дифтерійної вакцини [7].

Поточні рекомендації ВООЗ сформульовані таким чином, щоб виключити можливість відновлення токсичності, особливо це стосується інактивованого токсину після очищення, задля чого в тесті на відновлення токсичності період інкубації очищеного анатоксину при 37 °С збільшено до 6 тижнів [7].

В деяких країнах контроль безпечності вакцинних препаратів на тваринах замінено на культури клітин. В американській фармакопеї регламентовано, що реакція клітин за цитопатичною дією ділиться на п'ять ступенів, де нульова – повна відсутність будь-яких змін в моношлі культурі клітин. В міжнародній практиці, як і в американській фармакопеї, при визначенні безпечності імунопрофілактичних засобів на культурах клітин, використовується чотириохрестова система цитопатичної дії. Безпечним вважається препарат, який оказує «м'яку» дію – викликає гибель не більш ніж 50 % клітин. Дослідниками було перевірено безпечність АКДП вакцини російського виробництва, яка в експериментах на тваринах показала відсутність токсичних властивостей. Вивчення цитопатичної дії даного імунопрофілактичного препарату довело «надтяжку» його дію на клітини людини, що не було встановлено на тваринах [20]. Внаслідок чого, бажано для визначення безпечності АКДП препарату

застосовувати більш чутливу біологічну модель ніж лабораторні тварини. В американській фармакопеї метод визначення безпечності біологічних препаратів за допомогою культури клітин впроваджено з 1990 року [20].

Серед методів визначення токсигенності коринебактерій за допомогою культур клітин виділяють: COT (colony overlay test – тест накладення колонії), з моношаром клітинної культури HeLa, за допомогою культури клітин Vero (kidney cells of african green monkeys – клітини нирки африканських зелених мавп), з використанням культури клітин СНО (Chinese hamster ovary – культура клітин яєчників хом'яка). В основі зазначених тестів лежить цитопатична дія токсину *C. diphtheriae* на чутливі до нього культури клітин. Цитопатичну дію токсину визначають мікроскопічно та візуально:

- якісний метод COT визначає наявність дифтерійного токсину за дефектами забарвлення моношару культури клітин, коли токсигенна культура повністю або частково руйнує зону моношару;
- кількісний метод, який за відсотком ушкоджених клітин HeLa після співкультивування їх з коринебактеріями, продукуючими токсин, дозволяє визначити дозу дифтерійного токсину (90-100 % пошкоджених клітин відповідає 2-2,5 DL_{min} дифтерійного токсину, 60-80 % пошкоджених клітин – 0,5-1 DL_{min} дифтерійного токсину, 10-20 % пошкоджених клітин – 0,1 DL_{min} дифтерійного токсину), проте, для проведення експерименту, необхідне знання морфології клітин-мішеней;
- кількісний метод визначення цитотоксичності токсину *C. diphtheriae* проводять за розрахунком кількості фільтрату, який вбиває 50 % клітин Vero у досліді (CD_{50} /мл);
- з використанням культури клітин СНО, у яких, під впливом інгібуючих концентрацій токсину *C. diphtheriae*, ріст та продукування достатньої кількості метаболітів пригнічується, рН індикатора не змінюється, середовище залишається рожевим [18].

Проведено дослідження впливу дифтерійного токсину на клітини імунної системи мишей та мурчаків: спленоцити, адгезивні фагоцити і В-лімфоцити. Цитопатичний вплив токсину коринебактерій на спленоцити мурчаків почав проявлятися з концентрації 0,00001 нг/мл, а на подібні клітини мишей – з концентрації 0,1 нг/мл. Життєздатність клітин після інкубації з токсином оцінювали при їх забарвленні трипановим синім і підрахунку в камері Горяєва. Результати експерименту показали, що дифтерійний токсин може проникати у фагоцити і специфічні до нього В-лімфоцити та викликати їх загибель. Цитотоксичний ефект дифтерійного токсину відносно даних клітин свідчить о наявності можливості заміни лабораторних тварин альтернативними методами [14].

Культури клітин високочутливі до надзвичайно низьких доз токсину. Вивчення більш 300 серій АКДП вакцини російського виробництва на ембріональних фібробластах людини, показало високотоксичність всіх серій без винятку; метод можна використовувати як альтернативний для оцінки безпечності біологічних препаратів [20].

Перевагами використання культури клітин для визначення токсигенності коринебактерій є простота, стандартизування та точність оцінки. Недоліком вивчення наявності дифтерійного токсину з застосуванням культури клітин є відтворення методу лише в спеціальних лабораторіях, які мають відповідне обладнання для роботи з живими клітинами [13, 27].

Розроблено альтернативний спосіб виявлення токсину *C. diphtheriae*, який не потребує використання лабораторних тварин. Кількісний метод визначення токсину передбачає застосування полістиролового планшету, покритого експериментальними моноклональними антитілами до тієї частини дифтерійного токсину, який визначає його зв'язування з клітиною. При додаванні дослідної проби, антитіла будуть зв'язуватися з токсином із проби подібно клітині, що дозволить визначити кількість зв'язаного токсину. Кількісний вміст токсину можна визначити при його титруванні та при постановці реакції нейтралізації, в котрій визначення кількості зв'язаного токсину здійснюється за допомогою реактивів, що дають кольорову реакцію [11].

В науково-дослідницьких експериментах деякі вчені замінюють використання лабораторних тварин на альтернативні методи. Для виявлення дифтерійного токсину відомі реакції зворотної пасивної гемаглютинації та зворотної пасивної латекс аглютинації. Простими, швидкими, чутливими методами визначення токсину *C. diphtheriae* є імуоферментний метод (поріг чутливості 0,1 нг/мл), тест із імунохроматографічними стрічками (поріг чутливості 0,5 нг/мл), імуноблотинг, заснований на поєднанні електрофорезу та імуоферментного методу (поріг чутливості 0,1-1,0 мкг/мл) [18].

В науковій практиці використовують математичне моделювання для прогнозування ефективності вакцинних препаратів. Високоєфективна вакцина, згідно клінічних досліджень серед дітей в Європі та в Латинській Америці, викликає сумнівні відносно ефективності при імунізації нею населення України. Завдяки методам молекулярно-біологічних досліджень оцінено особливості циркуляції генотипів збудника на території України. На основі отриманих даних, методами дистрибутивного і мультиплікативного синтезу прогнозована генотип-специфічна ефективність вакцини, що дозволило отримати попередню, до проведення клінічних випробувань, досить високу (80,4 %), оцінку ефективності за умови її масового використання серед населення України [19].

Відомий також спосіб контролю детоксикації токсинів дифтерії за допомогою вимірювання флуоресценції в інтервалі довжин хвиль 300-600 нм та визначення інтенсивностей флуоресценції у максимумах на довжинах хвиль 360 нм та 450 нм. Зміна інтенсивностей максимуму флуоресценції характеризує наявність детоксикації нативних токсинів [24].

Удосконалення методів контролю вакцинних препаратів, незважаючи на велику кількість нових досягнень, згодом зберігає свою актуальність. Це пов'язано, насамперед, з післявакцинальними ускладненнями, побічними ефектами, які виникають внаслідок застосування імунопрофілактичних засобів.

Наприклад, загальна кількість ускладнень після вакцинації БЦЖ складає 0,02–1,2%, після ревакцинації – 0,003% [25]. Вакциноасоційований паралітичний поліомієліт розвивається в 1,5-2,2 випадків на 1 млн. використаних доз оральної поліомієлітної вакцини (ОПВ) та 1,1-1,2 випадку на 1 млн. у разі щеплення ОПВ [26]. Статистичні дані ВООЗ, за станом на 1998 рік, частоти післявакцинальних ускладнень на 100 тисяч вакцинованих АКДПВ наступні: стійкі мозкові порушення - 0,2-0,6, енцефалопатія і енцефаліт - 0,1-3,0, судороги - 0,3-90, шок - 0,5-30 та 0,2 летальних випадки [5]. Отже, даний напрямок вакцинології потребує збільшеної уваги з боку науковців та держави.

References

1. WHO. Media centre // Immunization coverage. Fact sheet Updated September 2016. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs378/en/>
2. WHO. Global Vaccine Safety // Global Vaccine Safety Initiative in planning phase URL: http://www.who.int/vaccine_safety/news/GVSI_news/en/
3. Semenov B.F., Vorobyev A.A., Egorov N.B. Expected prospects vaccinology to 2020 // *Fundamental Directions of Fundamental Medicine*. SPb. 2005. P. 328–392.
4. On approval of the Concept of the State program on development and implementation of the standardization of medicines and medical products for the period till 2015 // CMU draft order of the State Inspectorate for Quality Control of the Ministry of Health of Ukraine.
5. World Health Organization // URL: <http://www.who.int/en/>
6. Quality and safety of vaccines from development to delivery // WHO. Information bulletin. 2005. November. N 295.
7. WHO Expert Committee on Biological Standardization WHO // Technical Report Series 800. Geneva.1992. P. 207.
8. [Provedenie opytov na zhyvotnykh]. Animal Experimentation. // URL: http://www.animalmosaic.org/Images/Animal%20Experimentation_Russian_tcm46-28242.
9. Vaughan Monamy Animal Experimentation: A Student Guide to Balancing the Issues. Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching. English 1996. 56 p.
10. Hajime Kojima JaCVAM: An organization supporting the validation and peer review of new alternatives to animal testing. // *World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences*. Tokyo, Japan. 2007. August. P. 21-25. URL: <http://altweb.jhsph.edu/wc6/paper483.pdf>.
11. Titova N. Diphtheria: vaccination, modern methods of laboratory diagnostics // *Nursing*. 1998. №5-6.
12. Lyapunov M.A. Soloviev A.S., Stetsiv V.V., George V., Bezuglaya A.P. The standardization of pharmaceutical products - the foundation of the pharmaceutical sector in Ukraine // *Farmrada*. 2012.
13. Annex 4. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of diphtheria vaccines (adsorbed) Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 800, and Annex 5 of WHO Technical Report Series, No. 927. URL: http://www.who.int/biologicals/vaccines/Diphtheria_Recommendations_TRS_980_Annex_4.pdf?ua=1.
14. Romaniuk S.I. Antigenic and immunological properties of diphtheria toxin and its subunits // author. dis. zdo on ... kand.biol. Science. specialty - 02.00.10 bioorganic chemistry. - Kyiv, 2002.
15. European Commission. // URL: <http://ec.europa.eu/Drugs>.
16. Drugs. Good manufacturing practice. Guidance ST-H Ministry of Health 42-4.0:2015 // Ministry of Health of Ukraine. Kyiv. 2015 URL: http://aipm.org.ua/wp-content/uploads/2015/08/GMP_2015.pdf.
17. Drugs. Production of finished drugs. Guidelines for Quality 42-3.4: 2004 // Ministry of Health of Ukraine. Kyiv. 2004.
18. Babych Ye. M. Methods for determining the properties of toxigenic corynebacteria // *Guidelines*. 2009. 29 p.
19. Solovyov S. O. Mathematical modeling as a modern tool of projecting the efficacy of rotavirus vaccines // *Medical informatics and engineering*. 2011. № 2. P. 59-63.
20. Chervonskaya, G. P. Privivki: myths and reality. Alternative biological models in the medical experiment // URL: http://www.homeopatica.ru/library.shtml?1_29_para.s.html.
21. Maltsev, V. Clinical trials of medicines in Ukraine // *Weekly Pharmacy*. 2002. № 20 (341). URL: <http://pda.apteka.ua/article/13012>.
22. Goncharov, I. Pharmacovigilance in Ukraine: realities and prospects // *Therapia. Ukrainian Medical Herald*. 2007. №7-8 (17). URL: <http://therapia.ua/therapia>.
23. Background to conduct clinical trials in Ukraine // Department of expertise of pre-clinical and clinical trials of the State Expert Center MOZ Ukraine. 05.08.2014.
24. Control method of detoxification of diphtheria toxin: pat. 80581 Ukraine. Number 201212005; appl. 01.04.2004; publ. 10.06.2013, Bull. Number 11.
25. Lin Ch.J., Yang W.S., Yan J.J., Liu Ch.Ch. // *J. Bone Joint Surg*. 1999. V. 81-A. N 9. P. 1305–1311.
26. Small V.P. Poliomyelitis: modern problems // *Clinical Immunology. Allergology. Infectology*. 2010. № 4. P. 57-66 URL: <http://immuno.health-ua.com/article/471.html>.
27. Manual for Quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines // World Health Organization. 2013. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80681/1/WHO_IVB_11.11_eng.pdf?ua=1.

UDC: 579.871.1:612.118.22:612.08

METHODS OF CONTROL DIPHTHERIA VACCINE SAFETY

Isayenko Ye. Yu., Babych Ye. M., Yelyseyeva I. V., Zhdamarova L. A., Belozersky V. I., Kolpak S. A.

Vaccination success depends not only on the timely coverage of threatened contingents, but also on the quality of vaccines. Every day, the requirements for security guarantees vaccines and their use guarantees of security increases. For the fast, reliable and independent scientific assessment of vaccine safety issues, WHO in 1999 created the Global Advisory Committee on Vaccine Safety. To enhance the capacity of pharmaceutical supervision in relation to vaccines in 2012 it was developed the Global Vaccine Safety Initiative. The main directions of the Global

Vaccine Safety programs are considered in this review. It's noted more strict requirements of Ukrainian pharmaceutical industry to produce public immunization drugs regulated Supplements to the State Pharmacopoeia of Ukraine, in comparison with other countries. This review considered diphtheria vaccine safety monitoring in the process of production according to the recommendations of the World Health Organization (WHO), described a subcutaneous method for determining the specific toxicity of the combined purified toxoid, characterized an intracutaneous method of determining of the presence of diphtheria toxin in each sample of the combined purified toxoid, that additionally used by some manufacturers. The definition of diphtheria toxin in dilutions of purified toxoid is presented. This review considered diphtheria vaccine safety monitoring in the process of production according to the recommendations of the World Health Organization (WHO), described a subcutaneous method for determining the specific toxicity of the combined purified toxoid, characterized an intracutaneous method of determining of the presence of diphtheria toxin in each sample of the combined purified toxoid, that additionally used by some manufacturers. The definition of diphtheria toxin in dilutions of purified toxoid is presented. As methods for determination of diphtheria toxin must be able to detect even a small amount of toxin it's examined the WHO's proposal to use an intradermal method on guinea pigs and tests on cell cultures. Attention is drawn to the fact that the determination of specific toxicity in cell culture can be carried out at presence of the approval of this method of a national control authority and sensitivity rates no less than in experiments on guinea pigs. The determining of specific toxicity of ready vaccine by subcutaneous method is described. The publication gave a test for elevated toxicity of the final product by intraperitoneal infection of mice and guinea pigs. It's cited the WHO recommendations aimed at removing the possibility of recovery of the refined toxin toxicity. Checking vaccines toxicity, pyrogenicity, sterility, allergenicity, teratogenicity, mutagenicity and immunogenicity mainly performed on laboratory animals. The review examined the unreliability of animal experiments and the need to find alternative methods for determining the toxicity without their use particularly in light of the "3R" concept. Methods for determining diphtherial toxin using cell cultures is considered, namely, colony overlay test (COT), tests using a monolayer of HeLa cell culture, a culture of Vero cells (kidney cells of african green monkeys), a culture of CHO cells (cells of Chinese hamster ovary), which are based on the toxin cytopathic effect on sensitive cell culture. Their advantages and disadvantages are listed. An alternative method for the quantitative detection of *C. diphtheriae* toxin using the polystyrene plate coated with monoclonal antibody to the part of the diphtheria toxin which defines its binding to the cell, is described. It's regarded the cytotoxic effect of diphtheria toxin on cells of the immune system of mice and guinea pigs: splenocytes, adhesive phagocytes i B-lymphocytes.

Key words: diphtheria vaccine, safety, diphtheria toxin, toxoid, cell culture, laboratory animals.