# ایجاد یک روش نوین آزمایشگاهی الایزا توبی (ToBi Assay) برای تعیین کارایی واکسن بومی توکسوییدی کزاز در ایران

*اسماعیل اصلی: بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقِقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران (*نویسنده مسئول). e.asli@rvsri.ac.ir

رویا صدری: بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقِقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. r. sadri@rvsri.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱/۱۷

**چکیده**

**زمینه و هدف:** یکی از کاربردهای اصلی استفاده از حیوانات آزمایشگاهی به روش *in vivo* در مراکز تولید واکسن در تست های کنترل کیفی (کارائی: Potency) است که اخیرا به دلیل مشکلات خاص در استفاده از حیوانات آزمایشگاهی جایگزینی این آزمون به روش *in vitro* ارائه شده است. تست مهار سازی اتصال توکسین (Toxin Binding Inhibition - ToBi) یکی از این روش ها است که بر مبنای مهار اتصال توکسین به آنتی توکسین متصل به پلیت الایزا است. از اهداف اصلی در این پژوهش بررسی روش فوق برای تعیین کارایی توکسوئید کزاز و مقایسه آن با آزمون خنثی سازی سرم (Serum Neutralization Test, SN) است. جایگزین نمودن استفاده از آزمون الایزا (*in vitro*) بجای استفاده از آزمون‌های چالش challenge و یا آزمون خنثی سازی سرم (SN) در کنترل کیفی واکسن کزاز، و جایگزینی این روش به عنوان یک روش استاندارد و پیشنهاد شده توسط کمیسیون اروپایی فارماکوپه و WHO، از اهداف مهم پژوهش حاضر است.

**روش کار:** در این روش گروهی از موش های آزمایشگاهی نژاد (NIH) را بوسیله رقت های مناسب از واکسن تولید موسسه رازی و واکسن مرجع توکسوئید کزاز (NIBSC) ایمن نموده و پس از خون گیری و جداسازی سرم، عیار واکسن (کارایی) به روش الایزا (*in vitro*) سنجیده شد. برای انجام آزمون خنثی سازی سرم (SN) نیز خوکچه‌های هندی را با نیمی از دز مورد استفاده در مطالعات انسانی ایمن نموده و جهت انجام تست ToBi رقت های مختلف از سرم تهیه شد که با مقادیر متفاوتی از توکسین کزاز مجاور گردید. مخلوط حاصل پس از طی دوره نگهداری در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس، در پلیت الایزا کد شده وبا آنتی تتانوس ایمونوگلوبین (Horse anti tetanus IgG ) اسبی منتقل, با افزودن Anti T IgG، نشاندار شده با HRP، میزان توکسین آزاد سنجیده شد.

**یافته‌ها:** نتایج بدست آمده از روش مهار سازی اتصال توکسین (ToBi) با روش SN مقایسه گردیدند. دامنه نتایج عیار توکسوئید کزاز از ۱/۸-۵/۳ IU/ml متغیر بودند. با استفاده ازروش آزمون آماری Parallel line analysis این نتایج اختلاف معنی داری را نشان ندادند ($p<۰/۰۵$).

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل نشان داد که استفاده از این روش امکان ارزیابی واکسن های با عیار پائین راهم ممکن می سازد. در نتیجه می توان این روش را نسبت به آزمون های معمول مانند خنثی سازی سرم و آزمون چلنج واکسن (Challenge Test) دارای مزایای بیشتری از جمله کاهش استفاده از حیوانات آزمایشگاهی، ملاحظات اخلاقی و صرفه جوئی در زمان و هزینه دانست.

**کلیدواژه‌ها:** آزمون مهار سازی اتصال توکسین (ToBi) ، واکسن بومی کزاز، آزمون خنثی سازی سرم (SN)

## مقدمه

یکی از اهداف مهم کنترل کیفیت تولید واکسن بررسی میزان ایمنی‌زایی کزاز است. سال‌های زیادی است که این کنترل معمولاً توسط چلنج واکسن (Challenge Test) و یا آزمون خنثی سازی سرم (Serum Neutralization Test, SN) با استفاده از تعداد زیادی حیوان مانند موش و یا خوکچه (*invivo*) انجام می‌شود (۵-۱).

نظر به اهمیت تولید این واکسن برای جامعه و با توجه به مصرف هزینه‌های زیاد اقتصادی و محدودیت‌ها اجرایی آزمون‌های کنترل کیفی در استفاده از روش‌های challenge و SN از یک سوی و تحت تأثیر بودن حیوان آزمایشگاهی از شرایط محیطی از سوی دیگر موجب خطای

[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

تشخیص می‌گردد؛ بنابراین نیاز به توسعه آزمون *in vitro* و کاهش استفاده از حیوان آزمایشگاهی در واکسن مورداستفاده حائز اهمیت می‌باشد.

لذا بکار بردن روشی از قبیل جایگزینی (Replacement)، کاهش (Reduction) و یا ایجاد پالایش (Refinement) که دارای ارزش علمی و اجرایی مناسبی باشد و استفاده از حیوان آزمایشگاهی را به حداقل برساند، می‌تواند در روند تولید و کنترل فرآورده‌های بیولوژیکی از جمله واکسن‌ها مؤثر باشد (۴-۸). تست مهار سازی اتصال توکسین، توبی (Toxin Binding Inhibition - ToBi) یکی از این روش‌ها است که بر مبنای مهار اتصال توکسین به آنتی‌توکسین متصل به پلیت الایزا است. هدف از این مطالعه راه‌اندازی روش فوق برای تعیین کارایی (Potency) توکسوئید کزاز و مقایسه آن با آزمون خنثی سازی سرم (Serum Neutralization Test, SN) است. جایگزین نمودن استفاده از آزمون الایزا (*in vitro*) بجای استفاده از آزمون‌های چلنج challenge و یا آزمون خنثی سازی سرم در کنترل کیفی واکسن کزاز و جایگزینی این روش به‌عنوان یک روش استاندارد و پیشنهاد شده توسط کمیسیون اروپایی فارماکوپه و WHO، از اهداف مهم پژوهش حاضر است. لذا با توجه به پیشنهاد WHO (۹ و ۱۰) و فارماکوپه اروپا (۱۱) در مورداستفاده از آزمون الایزا در تعیین کارائی و عیار سنجی واکسن کزاز، این آزمون می‌تواند جایگزینی مناسب برای روش‌های معمول عیار سنجی، از جمله آزمون خنثی سازی سرم SN و آزمون challenge باشد (۱۴-۱۲).

## روش کار

در روش خنثی سازی سرم (SN)، تعداد ده سر خوکچه هندی به اوزان ۲۵۰-۳۵۰ گرم از نژاد Pirbright انتخاب و مقدار نصف دز انسانی واکسن کزاز به طریق بین جلدی تزریق شد و بعد از ۵ هفته خون‌گیری و سرم خون جدا شد. محلول توکسین کزاز با غلظت معادل ۰/۰۵mg/ml در آب پپتونه استریل تهیه شد. سپس با استفاده از سرم های جدا شده از خوکچه های ایمن شده با (واکسن‌های تست و استاندارد) ده رقت مناسب تهیه گردید. به هر یک از این رقت‌ها یک میلی‌لیتر از محلول توکسین افزوده و به مدت یک ساعت در محیط آزمایشگاهی انکوبه گردید. همزمان از سرم استاندارد نیز رقت‌های مانند قبل تهیه و هر کدام با یک سی‌سی از توکسین مایع مخلوط و به مدت یک ساعت در محیط آزمایشگاه انکوبه شدند. مقدار ۰/۵ میلی لیتر از هر رقت مخلوط توکسین و آنتی‌توکسین (سرم خوکچه‌های ایمن) به موش‌های ۲۲-۱۷ گرمی از نژاد NIH به روش داخل عضله (IM) تزریق انجام شد. در فاصله زمانی ۵-۱ روز پس از تزریق موش ها از نظر علایم انقباضی (تتانی) و مرگ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

در روش مهار سازی اتصال توکسین (ToBi)، موش‌های ۲۲-۱۷ گرمی انتخاب و در گروه‌های موردنظر (۳۲ عدد موش در ۴ گروه ۸ تایی) تقسیم شدند و مورد تزریق توکسوئید کزاز (نمونه آزمایش و نمونه استاندارد) به صورت زیر جلدی با رقت‌های مختلف قرار گرفتند. سپس ۵ هفته بعد از آن‌ها خون‌گیری به عمل آمد و سرم خون آن‌ها جدا شد و در ۲۰°C - تا مراحل بعدی آزمایش نگهداری شدند.

جهت انجام آزمون ToBi از میکروپلیت های نود و شش خانه‌ای استفاده شد. رقت‌های مختلف از سرم های (نمونه آزمایش و نمونه استاندارد) تهیه شد که با مقادیر متفاوتی از توکسین کزاز مجاور گردید. مخلوط حاصل پس از طی دوره نگهداری ۱۸ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس، در میکروپلیت الایزا کد شده و با آنتی تتانوس ایمونوگلوبین Horse anti tetanus IgG) اسبی منتقل، با افزودن Anti T IgG، نشاندار شده با HRP (Horse Raddish Peroxidase)، نتایج میزان توکسین آزاد شده در چاهک‌های موجود به کمک الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر سنجیده شد.

مطالعات آماری این تحقیق بروش آزمون آماری Parallel line analysis (۱۶،۱۵) با استفاده از نرم‌افزار SAS 9 جهت انجام محاسبات مقایسه‌ای عیار سرمی گروه‌ها استفاده شد.



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

## یافته‌ها

نتایج به‌دست‌آمده از روش مهار سازی اتصال توکسین (ToBi) با روش SN مقایسه گردیدند. دامنه نتایج کارایی توکسوئید کزاز از ۱/۸- ۵/۳ IU/ml متغیر بودند (جدول ۱). مقدار کارایی توکسوئید کزاز با استفاده از آزمون ToBi از ۱/۸-۵/۳ IU/ml و همچنین مقدار کارایی توکسوئید کزاز توسط آزمون SN از ۳.۳ IU/ml تا ۶ برای واکسن های dT و DT متغیر بودند. یافته‌ها و نتایج بین آزمون ToBi و SN به‌دست‌آمده از داده‌ها در شرایط آزمایشگاهی قابل اعتماد بود و با استفاده از روش آزمون آماری Parallel line analysis این نتایج اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند (p<۰/۰۵).

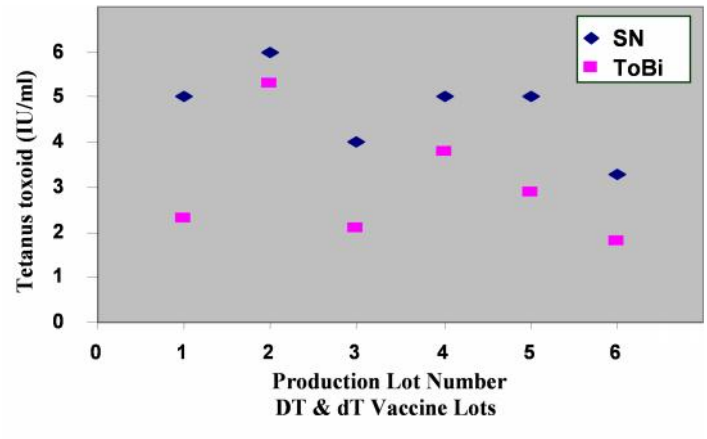
نمونه واکسن توکسوئید کزاز استاندارد را از مرکز NIBSC انگلستان تهیه و آزمایش ToBi انجام شد. نمونه آنتی‌توکسین کزاز استاندارد ملی در موسسه رازی و توکسین کزاز استاندارد ملی در موسسه رازی با غلظت ۰/۰۵ mg/ml برای آزمایش SN انجام شد. ضریب همبستگی محاسبه شده بین نتایج آزمون SN و آزمون ToBi عدد r= ۰/۹۴۱ و (p<۰/۰۵) را نشان داده شد (نمودار شماره یک). این نتایج نشان داده شد که رابطه همبستگی خوبی در این آزمون ها برای هر یک از واکسن dT و DT وجود دارد.

## بحث و نتیجه‌گیری

این روش ابتدا در سال ۱۹۸۶ میلادی توسط Kreeftenberg (۵)، برای تعیین کارایی توکسوئید کزاز و دیفتری معرفی گردید و توسط محققین

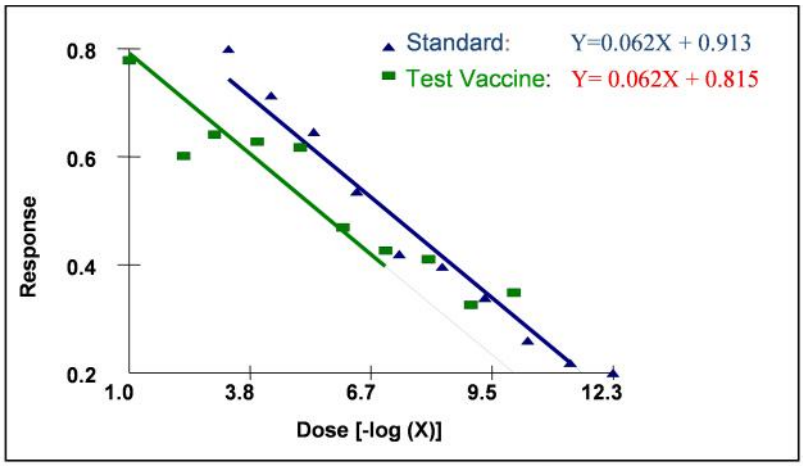
جدول ۱- کارایی توکسوئید کزاز به روش SN و ToBi.

| نمونه (توکسوئیدکزاز) | روش آزمایش | نوع حیوان وتعداد حیوان (n) | کارایی توکسوئیدکزاز (IU/ml) |
|---|---|---|---|
| Lot No. 1 | ToBi | Mice 40 | 2.9 |
| | SN | G.pigs 10 & Mice 30 | 5 |
| Lot No. 2 | ToBi | Mice 40 | 1.8 |
| | SN | G.pigs 10 & Mice 30 | 3.3 |
| Lot No. 3 | ToBi | Mice 40 | 3.8 |
| | SN | G.pigs 10 & Mice 30 | 5 |
| Lot No. 4 | ToBi | Mice 40 | 2.3 |
| | SN | G.pigs 10 & Mice 30 | 5 |
| Lot No. 5 | ToBi | Mice 40 | 2.1 |
| | SN | G.pigs 10 & Mice 30 | 4 |
| Lot No. 6 | ToBi | Mice 40 | 5.3 |
| | SN | G.pigs 10 & Mice 30 | 6 |




نمودار ۱- ضریب همبستگی محاسبه شده اسپیرمن Spearman's correlation coefficient بین نتایج آزمون SN و آزمون ToBi استفاده از نرم افزار سیستم آنالیز آماری (SAS).

[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]




| | Standard | Test |
|---|---|---|
| Test of Linearity | $r^2$= 0.9922 Test PASSED! | $r^2$= 0.8002 Test |
| Test of Slope | $r^2$= 0.9812 Test PASSED! | $r^2$= 0.7902 Test |
| Test of Parallelism | $r^2$= 0.97 Test PASSED! | |
| Relative Potency | 0.381 | |
| 95 % Fiducial Limits | 0.179 – 0.668 (54.0 % – 201.7 %) | |
| Conc. of Standard vaccine | 10.000 IU/ml | |
| Conc. of Test vaccine | 3.813 IU/ml | |
| Lower & Upper Fiducial limits | 1.789 – 6.682 IU/ml | |

نمودار ۲- تعیین کارایی توکسوئید کزاز (Lot No. 3) به روش ToBi با استفاده ازآزمون آماریParallel line analysis و نرم افزار سیستم آنالیز آماری (SAS).

هلندی (۹و۴) و در طی چند سال اخیر توسط گروه دیگری از محققین کشورهای مختلف توسعه پیدا کرد (۱۴-۱۲). در سال ۱۹۹۷ توسط کمیسیون اروپایی فارماکوپه WHO (۱۰) به تایید رسید و نتیجه گرفته شد که در تعیین کارایی واکسن کزاز، ارتباط و هماهنگی مناسبی بین روش Challenge (*in vivo*) و تست الیزا (*in vitro*) وجود دارد. نتایج حاضر بیشتر نشان می دهد آزمایش توبی (ToBI) آزمونی بطور عملی دقیق و حساس است. همچنین آزمایشی کم هزینه و اقتصادی در مقایسه با آزمایش خنثی سازی سرم (SN) می‌باشد. در این مطالعه ارتباط خوبی بین آزمایش توبی و خنثی سازی سرم هر دو برای توکسویید کزاز به دست آمد (r=۰/۹۴۱). یافته ها در دو سطح آمار توصیفی و استنباطی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در سطح توصیفی به گزارش میانگین، انحراف معیار متغیرهای مورد مطالعه و در سطح استنباطی ضریب همبستگی و تحلیل رگراسیون مورد بررسی قرار گرفت. نمودار شماره (۱) میانگین و ضریب همبستگی مورد مطالعه را نشان می‌دهد. همچنین مطالعات بین‌المللی توسط Winsnes و Sobrinho (۱۳و۱۴) و همچنین توسط کمیسیون اروپایی فارماکوپه و WHO(۱۰)، آزمون توبی را در واکسن کزاز با موفقیت نشان داده اندکه این آزمون قادر به ارزیابی و تعیین کارآیی واکسن‌های با عیار بالا و پائین است. بنابراین با نتیجه‌گیری از این اعتبار سنجی علمی آزمون توبی و با مزیت هایی شامل عدم نیاز به تعداد زیادی از حیوانات و سهولت انجام و مستقیم و بی واسطه، جایگزینی این روش به عنوان یک روش استاندارد برای کنترل کیفیت واکسن‌های توکسوییدی کزاز و دیفتری توسط کمیسیون اروپایی فارماکوپه و WHO، آماده برای پذیرش نظارتی پیشنهاد شده است (۱۷و۱۰و۱۸).

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، به نظر می‌رسد که روش‌های آزمایشگاهی با قابلیت تکرارپذیری



[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

(همانند روش ToBi) جایگزین مناسبی برای روش‌های معمول که با مشکلات خاص خود همراه هستند. آزمایش توبی (ToBi) آزمونی عملی، دقیق، با قابلیت تکرارپذیری، حساس و توام با صرفه جوئی در وقت، هزینه و نیروی کار می‌باشد که از جنبه اقتصادی در مقایسه با آزمایش خنثی سازی سرم بسیار مقرون به‌صرفه می‌باشد. در نتیجه می‌توان این روش را نسبت به آزمون‌های معمول مانند تعیین کارائی همانند خنثی سازی سرم (SN) و Challenge Test دارای مزیت‌های بیشتری دانست که از جمله آن‌ها می‌توان به کاهش استفاده از حیوان آزمایشگاهی، ملاحظات اخلاقی و صرفه جوئی در زمان و هزینه‌ها دانست. همچنین تولیدکنندگان واکسن در سراسر جهان برای انجام تست‌های کنترل کیفی و بررسی ایمنی‌زایی واکسن‌ها، خود را به استفاده از این روش با هدف جایگزینی، کاهش و پالایش از حیوانات را ترغیب می نمایند (۱۸). پیشنهاد می‌شود که با اجرای معتبر سازی صحیح این روش می‌توان آن را به‌عنوان جایگزینی برای روش *in vivo* معرفی نمود. در ایران هیچگونه گزارش مستند و مطالعه مشابهی تا کنون انجام نشده است و با توجه به روند توسعه جایگزینی این روش به جای روش معمول از اهمیت بالائی برخوردار است.

## منابع


1. Hendriksen CFM, Gun JW, Kreeftenberg JG. The use of toxin binding inhibition (ToBI) test for the estimation of the potency of the diphtheria component of vaccines. J Biol Stand; 1989b. 17: 241-247
2. Hendriksen C, Winsnes R. Serological methods for potency testing of tetanus toxoid vaccines for human use. Dev Biol (Basel); 2002. 111:131-40.
3. Hendriksen CFM, Van der Gun JW, Marsman FR, Kreeftenberg JG. The use of the in vitro toxin binding inhibition (ToBI) test for the estimation of the potency of tetanus toxoid. Biologicals; 1991.19: 23–29.
4. Kreeftenberg JG. Report of an informal meeting about alternative methods for potency control of the diphtheria and tetanus components in vaccines. Develop. Biol. Stand; 1986. 65: 261-266.
5. Gupta RK, Siber GR. Comparative analysis of tetanus antitoxin titers of sera from immunized mice and guinea pigs determined by toxin neutralization test and enzyme linkedimmunosorbent assay. Biologicals; 1994. 22: 215-219
6. Bayne K, Turner PV. Laboratory Animal Welfare. Animal Welfare in Vaccine testing. .Academic Press, USA, Elsevier Inc; 2014:129-131
7. Huet M, Relyveld E, Camps S Simplified activity evaluation of several tetanus vaccines. Biologicals; 1992. 20: 35-43.
8. Marcovistz R, Matos DCS, Georgini RA, Sakauchi D. Potency control of diphtheria component in adsorbed vaccinesby in vitro neutralization tests. Biologicals; 2002. 29.
9. Hong HA, Hendriks J. The use of alternatives to animals tests in developing countries. In F Brown, CFM Hendriksen, D Sesardic (eds), Alternatives to Animals in the Development and Control of Biologicals Products for Human and Veterinary Use, Vol. 110, Dev. Biol. Stand. Basel, Karger; 1999: 209-214.
10. WHO-World Health Organization Manual of laboratory methods for potency testing of vaccine used in the WHO Expanded Program on Immunization: introduction to potency control of bacterial vaccines. Geneve. 1997; Doc WHO/VSQ/97.04.
11. European Pharmacopoeia. Assay of tetanus Vaccine adsorbed. France, Publisher: Maisonneuve S.A., 2005; V.2.2.9
12. Sesardic D, Hendriksen CFM. Alternatives to animals in the development and control of biological products for human and veterinary use. Biologicals; 1999. 27: 55-57.
13. Winsnes R, Sesardic D, Daas A, Behr-Gross ME. Collaborative Study for the Validation of Serological Methods for Potency Testing of Diphtheria Toxoid Vaccines. Pharmeuropa Bio; 2006. 1: 73-88.
14. Sobrinho EM, Cangussu ASR, Brandi IV, Sari RS, Almeida AC, Colen F, et al. Modified toxin-binding inhibition (ToBI) test for epsilon antitoxin determination in serum of immunized rabbits. Veterinary Immunology and Immunopathology; 2010. 138: 129-133.
15. Finney DJ. Statistical method in biological assay. London ; Charles Griffin, 1964 ; p.99-163.
16. Statistical Analysis System (SAS) software 2015; version 9.4, by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
17. Metz B, Brunel F, Chamberlin C, van der Gun J, Halder M, Jiskoot W, et al. The potential of physicochemical and immunochemical assays to replace animal tests in the quality control of toxoid vaccines. 2007. The report and 77 recommendations of ECVAM workshop 61. Alternatives to Laboratory Animals 35: 323-331.
18. Zuang V, Asturiol BD, Barroso J, Belz S, Berggren E, Bernasconi C, et al. EURL ECVAM




[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

Status Report on the Development, Validation and Regulatory Acceptance of Alternative Methods and Approaches; 2015. JRC97811, doi:10.2788/62058.

[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]

# Development of ELISA (TOBi) assay for determination of tetanus toxoid potency

*** Esmaeil Asli**, PhD, Department of Research and Development , Razi Vaccine and Serum Research Institute. Agricultural, Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran (* Corresponding author). e.asli@rvsri.ac.ir
**Roya Sadri**, DVM, Department of Research and development , Razi Vaccine and Serum Research Institute. Agricultural, Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

## Abstract

**Background**: One of the major uses of large number of laboratory animals in manufacturing the vaccines is the quality control testing of vaccines, particularly potency testing of vaccines containing the tetanus toxoids by either lethal challenge or serum neutralization tests. Recently, because of various difficulties to obtain quality laboratory animals and in adequate environmental conditions, a lot of efforts have been made (such as those of World Health Organization's) to attempt to limit the use of animals (in vivo) in the research in routine quality control of human and veterinary vaccines by in vitro assays such as Toxin Binding Inhibition (ToBi) assay. ToBi assay is based on the inhibition of the binding of toxin to an antitoxin-coated ELISA plate which detects the free toxin into the toxin-serum mixtures. In this study we tried to demonstrate and setting up the parameters of ToBi assay for the tetanus toxoid potency determination compared with serum neutralization test.

**Methods**: Groups of mice were immunized with several of dilutions of reference or test tetanus toxoid vaccines and groups of guinea pigs were also immunized (for Serum Neutralization test) with the dose of half of total human dose of tetanus toxoid vaccines manufactured by Razi Vaccine & Serum Research Institute. Serum samples were pooled and titrated for levels of tetanus antitoxin by toxin binding inhibition (ToBi) test and by the serum neutralization (SN) test in mice. The ToBi test was carried out by making of Serum dilutions and a fixed amount of tetanus toxin added to each serum dilution. After incubation, the mixtures were transferred on to ELISA plate coated with purified equine anti-tetanus IgG. Then free toxin is detected by addition of HRP labelled equine anti-tetanus IgG.

**Results**: The results were shown to be significantly correlated. The consistency between the ToBi test derived from the in vitro data and from the in vivo data were reliable. The results ranged from 1.8 to 5.3 IU/ml for tetanus toxoid vaccines by ToBi test and 3.3 to 6 IU/ml for tetanus toxoid vaccines by SN in mice. The ToBi test may able to distinguish between highly potent and less potent vaccines.

**Conclusion**: It is concluded that the ToBi test is an alternative to the in vivo neutralization procedure in the immunogenicity test of the tetanus component in adsorbed vaccines. A substantial refinement and a reduction in use of animals can be achieved. The ToBi test offers distinct advantages in relationship to serum neutralization in mice and lethal challenge tests.

**Keywords**: ToBi test, Toxoid tetanus, Antibody titration, ELISA test

[ Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29 ]