

Особенности стандартизации туберкулиновых препаратов

Н. В. Александрова*, Д. Т. Леви, А. В. Наконечная, А. А. Савина

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

Согласно существующей в мире практике референс-материалы для оценки специфической активности препаратов очищенного туберкулина изготавливают из расчета использования в течение нескольких десятилетий, что предполагает их высокую стабильность. Так, туберкулин PPD-S, изготовленный в США в 1944 г., используется для международного стандарта очищенного туберкулина до настоящего времени в виде лиофилизатов в ампулах (PPDT), содержащих 5000 IU каждая. Материал для отечественного стандартного образца очищенного туберкулина ОСО ППД-Л-2 получен в 1973 г. в Ленинградском НИИВС. Многолетнее применение этой субстанции для контроля производственных серий очищенного туберкулина ППД-Л обусловлено высокой стабильностью показателя специфической активности ОСО ППД-Л-2, что должно периодически подтверждаться в широкомасштабном исследовании на различных экспериментальных моделях в соответствии с требованиями Всемирной организации здравоохранения.

Цель работы: оценить долгосрочную стабильность субстанции отраслевого стандартного образца очищенного туберкулина (ОСО ППД-Л-2) путем подтверждения его специфической активности относительно международного стандарта очищенного туберкулина и определить возможность использования этой субстанции для приготовления лиофилизированных образцов референс-препарата. **Материалы и методы:** специфическую активность ОСО ППД-Л-2 определяли относительно международного стандарта PPDT в соответствии с методикой, указанной в ФС.3.3.1.0023.15 Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания, используя морских свинок, вакцинированных различными субштаммами БЦЖ или сенсibilизированных вирулентными микобактериями («живыми» или «инактивированными») в соответствии с рекомендациями ВОЗ (WHO TRS 45, 1987). **Результаты:** анализ полученных данных позволил заключить, что величина показателя относительной активности ОСО ППД-Л-2 варьировала в 3–4 раза в зависимости от использованного для вакцинации морских свинок субштамма БЦЖ (модели сенсibilизации животных). Такое влияние модели титрования проявлялось при сравнении специфической активности туберкулинов, полученных различными методами осаждения туберкулопротеина (ППД-Л-2 и PPDT), т. е. отличающихся по составу антигенов. На животных, сенсibilизированных микобактериями туберкулеза, специфическая активность установленной ранее дозы ОСО ППД-Л-2 эквивалентна международному стандарту. **Выводы:** полученные в данном исследовании результаты оценки специфической активности ОСО ППД-Л-2 соответствуют данным, полученным при разработке и аттестации этого референс-материала в 1980-х гг., и подтверждают долгосрочную стабильность порошка-полуфабриката отечественного стандартного образца очищенного туберкулина. В то же время получение лиофилизированной формы ОСО, помимо экономической целесообразности, исключило бы определенное количество возможных ошибок, которые неизбежны при выполнении ежегодной процедуры приготовления и контроля разведений субстанции, и позволило бы сохранить ее количество, что увеличивает перспективы дальнейшего многолетнего использования ППД-Л-2 в качестве отраслевого стандартного образца.

Ключевые слова: туберкулин; отраслевой стандартный образец (ППД-Л-2); туберкулиновая единица (ТЕ, IU, TU); международный стандарт очищенного туберкулина (PPDS, PPDT); специфическая активность; сенсibilизация

Для цитирования: Александрова НВ, Леви ДТ, Наконечная АВ, Савина АА. Особенности стандартизации туберкулиновых препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2019;19(1):56–63. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-56-63>

Контактное лицо: Александрова Наталья Владимировна; AleksandrovaNV@expmed.ru

Specific Aspects of Tuberculin Products Standardisation

N. V. Aleksandrova*, D. T. Levi, A. V. Nakonechnaya, A. A. Savina

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

According to the existing international practice, reference materials, which are used to assess specific activity of purified tuberculin products, are meant to be used for several decades and are therefore characterised by high stability. For instance, PPD-S tuberculin produced in the USA in 1944 has been used ever since as the international reference standard of purified tuberculin and is stored as lyophilisate in ampoules (PPDT) containing 5000 IU each. The Russian PPD-L-2 industry reference standard is made from material produced by the Leningrad Research Institute of Vaccines and Sera in 1973. It has been used for many years to control production batches of PPD-L purified tuberculin because of its high stability that is regularly confirmed in large-scale studies using various experimental models in accordance with the requirements of the World Health Organisation. **The aim of**

the study was to evaluate the long-term stability of the substance of industry reference standard of purified tuberculin (PPD-L-2 IRS) by determining its specific activity relative to the international standard of purified tuberculin, and determine the feasibility of using this substance for the preparation of lyophilised reference product samples.

Materials and methods: PPD-L-2 IRS specific activity was determined relative to the PPDT international standard in accordance with the procedure specified in the monograph FS.3.3.1.0023.15 of the State Pharmacopoeia of Russian Federation (14 edition) using guinea pigs vaccinated with various BCG substrains or sensitized by virulent mycobacteria («live» or «inactivated») in accordance with the recommendations of the WHO (WHO TRS 45, 1987). **Results:** the analysis of the obtained data showed that there were 3–4-fold differences in PPD-L-2 IRS relative potency depending on the BCG substrain used for guinea pigs vaccination (animal sensitization model). This effect of the titration model manifested itself when comparing specific activity of tuberculins obtained by various methods of tuberculo-protein precipitation (PPD-L-2 and PPDT), i.e. different in antigen composition. The specific activity of the previously established dose of PPD-L-2 IRS was shown to be equivalent to the international reference standard in animals sensitized with mycobacteria tuberculosis. **Conclusions:** the results of PPD-L-2 IRS specific activity assessment obtained in this study are consistent with the data obtained during development and certification of this reference material in the 1980s and confirm the long-term stability of the intermediate powder product of the Russian reference standard of purified tuberculin. At the same time, the production of a freeze-dried form of the IRS, in addition to being economically feasible, would rule out some potential errors that are inevitable during annual preparation and control of the reference standard dilutions, and would make it possible to spare the substance which would improve prospects for the future long-term use of PPD-L as an industry reference standard.

Key words: tuberculin; industry reference standard (PPD-L-2); tuberculin unit (TU, IU); international reference standard of purified tuberculin (PPDS, PPDT); specific activity; sensitization

For citation: Aleksandrova NV, Levi DT, Nakonechnaya AV, Savina AA. Specific aspects of tuberculin products standardisation. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(1):56–63. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-56-63>

*Corresponding author: Natalia V. Aleksandrova; AleksandrovaNV@expmed.ru

Несмотря на значительные усилия по предупреждению распространения туберкулеза и некоторые успехи в борьбе с эпидемией этой инфекции, туберкулез продолжает оставаться глобальной проблемой здравоохранения во всем мире. Принятая туберкулезным сообществом пятилетняя Программа борьбы с этой инфекцией Stop TB Partnership не принесла ожидаемых результатов. В новой программе, действующей с 2015 г. и подписанной главами многих государств, изложен комплекс мероприятий по борьбе с туберкулезом. В структуре базовых положений этого документа подчеркнута необходимость своевременной «ранней диагностики туберкулеза»¹. Одним из инструментов в решении указанной задачи в нашей стране является массовая туберкулинодиагностика (проба Манту) с аллергеном туберкулезным в стандартном разведении (туберкулин) у детей². Важным элементом массовых диагностических мероприятий является использование стандартных серий туберкулина, так как увеличение размера реакции на пробу Манту по сравнению с предыдущей реакцией так же, как и впервые выявленная положительная реакция, влечет за собой комплексное обследование ребенка на туберкулез. В связи с этим каждую серию туберкулина стандартизируют относительно аттестованного стандартного образца. Согласно рекомендации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ)³ национальные стандарты (стандартные образцы) очищенного туберкулина должны быть сопоставлены с международным стандартом.

F. Seibert с сотрудниками в 1939 г. разработали технологию получения очищенного туберкулина ППД (purified protein derivative, PPD) из культуральных фильтратов вирулентного штамма *Mycobacterium tuberculosis*. Туберкулопротеин был

осажден сульфатом аммония с дополнительной очисткой трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и диализом. Этот метод очистки многократно снижал в препарате содержание полисахаридов, нуклеиновых кислот и липидов. В 1944 г. большая хорошо изученная серия очищенного туберкулина получила название PPD-S (S — Seibert) и была утверждена как стандартная серия для использования в США с целью диагностики туберкулеза. В 1952 г. часть партии этого туберкулина, названная PPDS, была принята ВОЗ в качестве международного стандарта специфической активности туберкулина [1]. Было установлено, что 1 IU (international unit, IU — международная единица) содержится в 0,028 мкг PPDS (0,02 мкг PPD и 0,008 мкг солей). В связи с истощением запасов PPDS в Датском институте сывороток (SSI) туберкулин из приготовленных F. Seibert «для специальных нужд» ампул PPDS восстановлен, разлит (доказана высокая точность розлива) по 5000 IU/ампула и лиофильно высушен⁴ [5]. После исследований, подтвердивших, что специфическая активность полученного лиофилизата эквивалентна активности PPDS, этот туберкулин в 1983 г. утвержден в качестве серии PPDT международного стандарта специфической активности очищенного туберкулина⁵. Таким образом, PPDT является все тем же туберкулином PPD-S, который получен F. Seibert в 1939–1944 гг.

В Ленинградском НИИВС в 1973 г. по модифицированному Линниковой методу изготовлена очередная партия субстанции (порошок-полуфабрикат) туберкулина ППД-Л (Л — Линниковой), предназначенная для второго национального стандарта очищенного туберкулина. При сопоставлении с первым национальным стандартом ППД-Л-1 (1 ТЕ которого содержалась в 0,06 мкг субстанции) на вакцинированных

¹ Шестидесят седьмая сессия Всемирной ассамблеи здравоохранения, Женева, 19–24 мая 2014 г.: резолюции и решения, приложения (WHA67/2014/REC/1). ВОЗ; 2014. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260353/A67_2014_REC1-ru.pdf?sequence=1&isAllowed=y

² Приказ Минздрава России от 29.12.2014 № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».

³ WHO Expert Committee on Biological Standardization: forty-fifth report. WHO technical report series 858. WHO; 1995. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/36999/WHO_TRS_858.pdf?sequence=1

⁴ WHO BS 81.1306. Purified protein derivative of mammalian tuberculin.

⁵ International standard for purified protein derivative (PPD) of mammalian tuberculin (WHO/BS/83.1408). Expert committee on biological standardization. WHO; 1983. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/60229/WHO_BS_83.1408_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y

БЦЖ и на зараженных *Mycobacterium tuberculosis* морских свинок определена доза субстанции ППД-Л-2, содержащая 1 ТЕ. Она составляла 0,015 мкг. Эта доза явилась основой для приготовления разведений ППД-Л-2 с целью проведения испытаний его активности относительно международного стандарта PPDS на морских свинок, вакцинированных различными субштаммами БЦЖ.

По результатам аттестации ППД-Л-2 относительно международного стандарта PPDS на животных, зараженных *M. tuberculosis*, установлено, что эквивалент одной международной единицы PPDS составляет 0,000015–0,00002 мг ППД-Л-2 (величина показателя зависела от уровня сенсибилизации морских свинок). Полученные данные соответствовали результатам постановки проб с этими препаратами на больных туберкулезом людях [2]. В 1980 г. ППД-Л-2 утвержден в качестве второго национального стандарта очищенного туберкулина и в 1986 г. внесен в Реестр отраслевых стандартных образцов, допущенных к применению в системе здравоохранения СССР и на предприятиях других ведомств, выпускающих иммунобиологические лекарственные препараты. В настоящее время согласно отечественным требованиям наименование «национальный стандарт ППД-Л-2» заменено на «отраслевой стандартный образец — ОСО ППД-Л-2 42-28-49».

Цель работы — оценить долгосрочную стабильность субстанции отраслевого стандартного образца очищенного туберкулина (ОСО ППД-Л-2) путем подтверждения его специфической активности относительно международного стандарта очищенного туберкулина и определить возможность использования этой субстанции для приготовления лиофилизированных образцов референс-препарата.

Задачей данного исследования является аттестация специфической активности ОСО ППД-Л-2 относительно международного стандарта очищенного туберкулина PPDT на различных моделях сенсибилизации животных с целью подтверждения долгосрочной стабильности ОСО.

Материалы и методы

Материалы

1. Международный стандарт очищенного туберкулина из *M. tuberculosis* (In. st. for Purified Protein Derivative (PPD) of *M. tuberculosis* Tuberculin 5.000 IU/ampoule (код NIBSC: PPDT, далее PPDT)).

2. Отраслевой стандартный образец очищенного туберкулина — ОСО ППД-Л-2 42-28-49 (далее ОСО ППД-Л-2 или ОСО).

3. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 1/47 и 102 (№ 700403 и 700403f соответственно, ГКПМ ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), лиофилизат.

4. Субштаммы *M. bovis* BCG.

4.1. Лиофилизат субштамма вакцины туберкулезной БЦЖ, Россия (BCG Vaccine of Russia BCG-1 sub-strain (1st WHO Reference Reagent)) International Reference Reagent (далее — BCG-1);

4.2. Лиофилизат субштамма вакцины туберкулезной БЦЖ, Япония (BCG Vaccine of Tokyo 172 sub-strain (1st WHO Reference Reagent)) International Reference Reagent (далее — BCG Tokyo);

4.3. Лиофилизат субштамма вакцины туберкулезной БЦЖ, Дания (BCG Vaccine of Danish 1331 sub-strain (1st WHO Reference Reagent)) International Reference Reagent (далее — BCG Danish).

5. Питательной средой для культивирования служила яичная среда Левенштейна–Йенсена.

⁶ СП 2.2.1.3218-14 от 29 августа 2014 г. № 51 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

6. Фосфатно-буферный раствор (ФБР), pH 7,38 с 0,02 % хинозола.

7. Хинозол: 8-оксихинолин (антимикробный агент).

8. Неполный адъювант Фрейнда (НАФ) (Dropper adjuvant incomplete Freund, USA).

9. Животные: морские свинки массой 300–350 г (масса указана на момент сенсибилизации) белокожие или альбиносы из питомника, филиал Андреевка, ФГБУ «НЦБМТ» ФМБА России.

Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими требованиями к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) 2014 г.⁶

Методы

Морских свинок делили по методу случайной выборки на группы (по 6 или кратное 6 количество животных в группе).

1. Сенсибилизация групп животных.

1.1. Вакцина БЦЖ: 16–20-дневная культура 2-й генерации используемого субштамма БЦЖ с поверхности среды Левенштейна–Йенсена (полувлажный вес), разведенная 0,9 % раствором натрия хлорида с НАФ (1:1) до содержания 0,5 мг в 0,2 мл препарата, внутрикожно по 0,1 мл в 2 места в область живота);

1.2. Инактивированная нагреванием (90 °С, 40 мин) разведенная 0,9 % раствором натрия хлорида с НАФ (1:1) 20-дневная культура 3-й генерации *M. tuberculosis* H37Rv 1/47 со среды Левенштейна–Йенсена (5 мг/мл), внутрикожно по 0,1 мл в 2 места в область живота.

1.3. Заражение.

а) *M. tuberculosis* H37Rv 1/47, 20-дневная культура 3-й генерации со среды Левенштейна–Йенсена, внутрибрюшинно (по 0,0002 мг в 0,2 мл);

б) *M. tuberculosis* H37Rv 102, 20-дневная культура 3-й генерации со среды Левенштейна–Йенсена, внутрибрюшинно (по 0,002 мг в 0,2 мл).

2. Определение (титрование) активности ППД-Л-2 относительно международного стандарта PPDT.

Для проведения испытания готовили разведения туберкулинов, используя ФБР:

- схема А: международный стандарт разводили до содержания 2, 10 и 50 IU в 0,1 мл, а ОСО ППД-Л-2 — до 2, 10 и 50 ТЕ в 0,1 мл;

- схема Б: PPDT разводили до содержания 5, 25 и 125 IU в 0,1 мл, а ОСО соответственно — до 5, 25 и 125 ТЕ в 0,1 мл.

Каждому животному группы из 6 морских свинок вводили внутрикожно по 0,1 мл методом случайной выборки:

- по три разведения (схема А или Б) двух сравниваемых туберкулинов;

- или по 4 пробы: 2 ТЕ и 2 IU сравниваемых туберкулинов;

- или по 4 пробы: 5 ТЕ и 5 IU сравниваемых туберкулинов.

3. Учет ответных реакций осуществляли через 24 ч два специалиста независимо друг от друга, измеряя 2 поперечных диаметра папулы (эритемы). Полученные данные усредняли, подсчитывали средний диаметр реакции на каждое разведение препарата и ошибки средних. При этом за испытуемый препарат всегда принимали ОСО ППД-Л-2, за стандарт — международный стандарт PPDT.

Статистический анализ результатов определения относительной активности (*R*) основан на линейном характере зависимости «lg доза–эффект» и методике «параллельных линий».

Таблица 1. Результаты оценки относительной активности ППД-Л-2/ PPDT на морских свинках, вакцинированных различными субштаммами *M. bovis* BCG (5, 25 и 125 TE / 5, 25 и 125 IU)
Table 1. The results of PPD-L-2/PPDT relative potency evaluation in guinea pigs vaccinated with different substrains of *M. bovis* BCG (5, 25 and 125 TU of PPD-L-2 IRS / 5, 25 and 125 IU of PPDT)

Сенсибилизация (субштамм вакцинации)	Средние реакции на дозу ППД-Л-2, мм			Средние реакции на дозу PPDT, мм			<i>b</i>	<i>R±m</i>
	5 TE	25 TE	125 TE	5 IU	25 IU	125 IU		
BCG-1	10,2	13,4	16,8	7,7	11,3	14,6	4,81	3,00 ± 0,07
BCG Tokyo	12,2	15,3	17,5	10,6	12,8	16,5	4,01	2,58 ± 0,13
BCG Danish	7,8	12,5	14,9	7,7	12,2	16,3	5,65	0,88 ± 0,09

Примечание. *b* — тангенс угла наклона прямых зависимости «доза-эффект», *R* — показатель относительной активности, *m* — ошибка средней.

$$\text{По формуле: } \bar{d} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N d_i, \quad (1)$$

где *N* — число точек на дозу, *d_i* — отдельный диаметр реакции на определенную дозу, вычисляли средние диаметры папул (эритем) (\bar{d}) на каждое разведение ОСО и PPDT и среднее квадратичное отклонение (σ):

$$\sigma_i = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\bar{d} - d_i)^2}{N - 1}}. \quad (2)$$

$$\text{По формуле } b = \frac{(\bar{d}_{\max}^{PPDT} - \bar{d}_{\min}^{PPDT}) + (\bar{d}_{\max}^{ОСО} - \bar{d}_{\min}^{ОСО})}{2(\lg D_{\max} - \lg D_{\min})}, \quad (3)$$

где \bar{d}_{\max} и \bar{d}_{\min} — средние диаметры реакций на максимальную (D_{\max}) и минимальную (D_{\min}) дозу PPDT или ОСО, вычисляли средний тангенс угла наклона прямых зависимости «доза-эффект» (*b*).

По формуле:

$$\lg R = \frac{(\bar{d}_{5TE}^{ОСО} - \bar{d}_{5TE}^{PPDT}) + (\bar{d}_{25TE}^{ОСО} - \bar{d}_{25TE}^{PPDT}) + (\bar{d}_{125TE}^{ОСО} - \bar{d}_{125TE}^{PPDT})}{bK} \quad (4)$$

где *K* — число слагаемых в числителе, определяли логарифм относительной активности (*lgR*). Относительная активность *R* равна $10^{\lg R}$. Таким же образом подсчитывали *lgR* при сравнении разведений туберкулинов до содержания 2, 10 и 50 туберкулиновых единиц в 0,1 мл буферного раствора.

$$\text{Используя формулы } \bar{\sigma} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \sigma_i \quad (5) \text{ и } m_{lgR} = \frac{\bar{\sigma}}{b \sqrt{K \frac{N_0}{2}}}, \quad (6)$$

где N_0 — количество животных в опыте; *n* — число средних (квадратичных отклонений), подсчитывали среднее квадратичное отклонение и стандартную ошибку для всего опыта. За доверительные границы принимали ± 2 стандартные ошибки (m_{lgR}). Специфическую активность двух туберкулинов в соответствии с ФС.3.3.1.0023.15⁷ на аллерген туберкулезный считают равной, если показатель относительной активности *R* равен (1 ± 0,2) с вероятностью 95 %.

При сопоставлении 2 или 5 TE ОСО ППД-Л-2 с соответствующими дозами PPDT (2 или 5 IU) оценку результатов проводили по индексу (*I*) специфической активности. Индекс специфической активности определяли как частное от деления среднего размера реакции на ОСО к среднему размеру реакции на аналогичную дозу PPDT. Средние реакции (\bar{d}) подсчитывали по формуле (1), а стандартное отклонение (σ) по формуле (2).

$$\text{Ошибку средней определяли по формуле: } m = \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}}, \quad (7)$$

где *n* — общее число проб, σ — стандартное отклонение. Специфическую активность ОСО считали равной этому показателю для стандарта, если индекс специфической активности ОСО равен 1 ± 0,05.

Результаты

В таблице 1 представлены результаты сопоставления специфической активности разведений ОСО ППД-Л-2 с активностью международного стандарта PPDT на морских свинках, сенсибилизированных субштаммом BCG-1, BCG-Tokyo или BCG-Danish.

На основании полученных результатов установлено, что показатель специфической активности ОСО ППД-Л-2 относительно международного стандарта значительно варьирует в зависимости от модели — субштамма БЦЖ, которым сенсибилизированы морские свинки. Так, при контроле относительной активности ОСО ППД-Л-2 на животных, вакцинированных датским субштаммом БЦЖ, специфическая активность ОСО ППД-Л-2 была равна специфической активности международного стандарта PPDT (*R* = 0,88). При вакцинации животных российским субштаммом БЦЖ показатель *R* относительной активности ОСО ППД-Л-2 был равен 3,0, т. е. почти в 3,5 раза превышал показатель, установленный на животных, сенсибилизированных датским субштаммом. Морские свинки, вакцинированные японским субштаммом, так же как животные, сенсибилизированные российским субштаммом, отвечали на ОСО ППД-Л-2 большими размерами реакций, чем на международный стандарт PPDT. Показатель относительной активности ОСО ППД-Л-2 был равен 2,58, что почти в 3 раза выше показателя, полученного на животных, вакцинированных датским субштаммом БЦЖ (*p* < 0,05).

В таблице 2 представлены результаты, полученные в опыте аналогичного дизайна, но при использовании для постановки внутрикожных проб меньших доз сравниваемых туберкулинов: 2, 10 и 50 TE ОСО ППД-Л-2 относительно 2, 10 и 50 IU PPDT.

Анализ полученных данных показал, что при сопоставлении туберкулинов PPD, полученных различными методами осаждения туберкулопротеина, результаты испытаний могут зависеть от выбранных для сравнения доз препаратов. Различия по показателям относительной активности препарата при сопоставлении сниженных доз сравниваемых туберкулинов на тех же моделях сенсибилизации животных были не столь значимыми. При этом на животных, вакцинированных датским субштаммом BCG, реакции на ОСО ППД-Л-2 тоже

⁷ Фармакопейная статья 3.3.1.0023.15 Туберкулин очищенный (ППД) (аллерген туберкулезный очищенный). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Таблица 2. Результаты оценки относительной активности ППД-Л-2/PPDT на морских свинках, вакцинированных различными субштаммами *M. bovis* BCG (2, 10 и 50 ТЕ ОСО ППД-Л-2 / 2, 10 и 50 IU PPDT)

Table 2. The results of PPD-L-2/PPDT relative potency evaluation in guinea pigs vaccinated with different substrains of *M. bovis* BCG (2, 10 and 50 TU of PPD-L-2 IRS / 2, 10 and 50 IU of PPDT)

Сенсибилизация (субштамм вакцинации)	Средние реакции на дозу ППД-Л-2, мм			Средние реакции на дозу PPDT, мм			<i>b</i>	<i>R±m</i>
	2 TE	10 TE	50 TE	2 IU	10 IU	50 IU		
BCG-1	10,2	13,7	17,1	8,8	12,9	16,2	5,16	1,60 ± 0,08
BCG Tokyo	9,7	13,9	18	9,5	12,9	16,8	5,57	1,42 ± 0,08
BCG Danish	9,1	13,6	16,4	8,3	12,6	15,5	5,16	1,50 ± 0,07

Примечание. *b* — тангенс угла наклона прямых зависимости «доза–эффект», *R* — показатель относительной активности, *m* — ошибка средней.

Таблица 3. Результаты оценки относительной активности разведений ОСО ППД-Л-2 на морских свинках, зараженных *M. tuberculosis* H37Rv

Table 3. The results of relative potency evaluation of PPD-L-2 IRS dilutions in guinea pigs infected with *M. tuberculosis* H37Rv

Сенсибилизация (заражение)		Средние реакции на дозу ППД-Л-2, мм			Средние реакции на дозу PPDT, мм			<i>b</i>	<i>R±m</i>
		5 TE	25 TE	125 TE	5 IU	25 IU	125 IU		
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 1/47, 0,0002 мг в/бр.	33 сут	9,3	12,8	17,1	10,2	13,7	16,7	5,16	0,81 ± 0,09
		9,1	12,9	16,2	10,4	13,0	16,3	4,65	0,79 ± 0,13
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 102, 0,002 мг в/бр.	42 сут	2 TE	10 TE	50 TE	2 IU	10 IU	50 IU	-	-
		9,7	13,3	16,9	10,5	14,2	16,5	4,73	0,80 ± 0,1

Примечание. *b* — тангенс угла наклона прямых зависимости «доза–эффект», *R* — показатель относительной активности, *m* — ошибка средней, в/бр. — внутрибрюшинное введение.

Таблица 4. Результаты оценки относительной активности разведений ОСО ППД-Л-2 на морских свинках, сенсибилизированных инактивированной культурой *M. tuberculosis*

Table 4. The results of relative potency evaluation of PPD-L-2 IRS dilutions in guinea pigs sensitized by inactivated *M. tuberculosis*

Сенсибилизация	Средние реакции на дозу ППД-Л-2, мм			Средние реакции на дозу, мм			<i>b</i>	<i>R±m</i>
	5 TE	25 TE	125 TE	5 IU	25 IU	125 IU		
Инактивированная культура <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	9,4	12,3	14,8	8,9	11,7	15,2	4,18	1,13 ± 0,13
	2 TE	10 TE	50 TE	2 IU	10 IU	50 IU	-	-
	7,0	12,4	16,2	6,4	11,4	15,4	6,52	1,32 ± 0,16

Примечание. *b* — тангенс угла наклона прямых зависимости «доза–эффект», *R* — показатель относительной активности, *m* — ошибка средней.

были статистически значимо выше, чем на PPDT. Полученные данные подтверждают, что не только состав туберкулинов, приготовленных с использованием разных технологических методов, штаммов и видов микобактерий, но и количественное содержание антигенов неодинаково. Это проявляется при сравнении разных разведений таких туберкулиновых препаратов.

В таблицах 3 и 4 приведены данные исследования специфической активности ОСО ППД-Л-2 относительно международного стандарта PPDT на животных, зараженных двумя дозами вирулентных *M. tuberculosis* или сенсибилизированных инактивированными микобактериями туберкулеза.

Анализ данных, представленных в таблицах 3 и 4, позволил установить, что специфическая активность ОСО в данной аранжировке опыта эквивалентна специфической активности международного стандарта туберкулина ($R = 0,8$). Показатель относительной активности ОСО ППД-Л-2 к международному стандарту при сопоставлении разведений 5, 25 и 125 ТЕ на морских свинках, зараженных дозой 0,0002 мг, и на животных, зараженных десятикратно большей дозой

(0,002 мг) *M. tuberculosis*, практически равны между собой ($R = 0,81 \pm 0,09$ и $R = 0,79 \pm 0,13$). Такие же результаты получены при сопоставлении ответных реакций на введение меньших доз (2, 10 и 50 ТЕ) сравниваемых туберкулинов ($p < 0,05$). В этом случае показатель относительной активности ($R = 0,80 \pm 0,1$) также находился на нижней границе допустимых колебаний ($R = 0,8-1,2$).

При проведении исследований на животных, сенсибилизированных инактивированными *M. tuberculosis* (табл. 4), реакции на разведения 5, 25 и 125 ТЕ туберкулина ППД-Л-2 были равны реакциям на аналогичные разведения международного стандарта PPDT, т. е. демонстрировали эквивалентную специфическую активность ($R = 1,13 \pm 0,13$).

В таблице 5 представлены результаты, полученные при сравнении реакций на введение исследуемых туберкулинов в разведении 2 или 5 ТЕ морским свинкам, вакцинированным российским субштаммом БЦЖ-1. Именно такие дозы используются при проведении туберкулинодиагностики у людей в мире: как правило, в странах с высокой распространенностью туберкулеза, в том числе в Российской Федерации, применяют

Таблица 5. Результаты сопоставления относительной активности 2 и 5 ТЕ ОСО ППД-Л-2 с 2 и 5 IU PPD-T
Table 5. The results of comparing the relative potency of PPD-L-2 IRS (2 and 5 TU) with PPD-T (2 and 5 IU)

Препарат	Доза	Средние реакции на дозу, мм	Индекс специфической активности (I)	t'
ОСО / PPD-T	2 ТЕ	10,95 ± 0,54	1,02	0,28
	2 IU	10,74 ± 0,54		
ОСО / PPD-T	5 ТЕ	13,48 ± 0,32	1,08	2,24
	5 IU	12,51 ± 0,29		

* t-критерий Стьюдента.

пробу Манту с 2 TU (tuberculin unit, туберкулиновая единица), а низкой распространенностью — с 5 TU.

Как следует из данных, приведенных в таблице 5, средние размеры реакций на 2 ТЕ ОСО ППД-Л-2 были такими же, как на 2 IU PPD-T (10,95 ± 0,54 и 10,74 ± 0,54 соответственно), $p \geq 0,95$. Индекс специфической активности был равен 1,02, т. е. не выходил за допустимые пределы (0,95–1,05 при $p < 0,05$). При сопоставлении разведений этих двух препаратов, содержащих 5 туберкулиновых единиц, средние реакции на 5 ТЕ ППД-Л-2 (13,48 ± 0,32) превышали реакции на 5 IU PPD-T (12,51 ± 0,29) при доказанной достоверности различий между средними величинами. При этом индекс специфической активности ППД-Л-2 был выше допустимого предела и был равен 1,08.

Обсуждение

В настоящее время не вызывает сомнения, что антигенные спектры вакцин БЦЖ, изготовленных из разных субштаммов, существенно различаются [3]. Российский и японский субштаммы БЦЖ относятся к группе ранних субштаммов, потерявших в основном RD1-регион генома. Генетические различия между ними незначительные. В то же время эти два субштамма БЦЖ имеют выраженные генетические и антигенные различия с датским субштаммом, который лишен не только RD1, но также основной части RD2-региона генома. Сравнимые туберкулины ППД-Л-2 и PPD-T также не идентичны по антигенному составу. Международный стандарт приготовлен из 1 штамма *M. tuberculosis*, туберкулопротеин был осажден сульфатом аммония с дополнительной очисткой ТХУ и диализом [4]. ППД-Л-2 приготовлен из 2 видов микобактерий — *M. tuberculosis* и *M. bovis*, а туберкулопротеин осажден ТХУ. Известно, что специфическая активность туберкулинов зависит от многочисленных факторов, включая штаммы микобактерий, питательные среды и сроки выращивания культур, методику осаждения и очистки туберкулопротеина, состав растворителя для получения растворов туберкулина при титровании специфической активности субстанции и для изготовления конечного продукта.

От метода получения туберкулина зависит также количественный состав примесей — полисахаридных комплексов, нуклеиновых кислот, липидов. Так, туберкулин PPD-S состоит из 92,9 % белка туберкулопротеина, 5,9 % полисахарида и 1,2 % нуклеиновых кислот [4], в ППД-Л-2 содержится значительно меньше белка (70 %) и значительное количество других фракций.

Характер примесей и их количество могут в значительной мере зависеть также от среды выращивания микобактерий-продуцентов. В итоге вышеописанных вариаций очищенные туберкулины разных производителей обладают неодинаковой активностью и специфичностью [5], что создает значительные трудности в стандартизации специфической активности очищенных туберкулинов относительно международного и национальных стандартов. Свое влияние оказывает также модель,

на которой проводится сопоставление различающихся в антигенном отношении туберкулинов. Результатом этих различий являются, например, неодинаковые размеры ответных реакций на неидентичные туберкулины у морских свинок, сенсibilизированных разными субштаммами БЦЖ. Это приводит к тому, что показатель активности испытуемого туберкулина относительно международного стандарта может в несколько раз различаться в зависимости от модели, на которой проводится сопоставление. Так, согласно полученным нами данным показатель специфической активности отечественного стандарта очищенного туберкулина ППД (ОСО ППД-Л-2 42-28-49) относительно международного стандарта PPD-T значительно отличается при проведении исследований на различных моделях сенсibilизации животных.

На основании проведенных исследований показано следующее.

1. При сопоставлении разведений препаратов туберкулина 5, 25 и 125 туберкулиновых единиц:

1.1. Чем больше различие между субштаммами, используемыми для вакцинации морских свинок, тем значительнее разница в показателе относительной активности испытуемого туберкулина.

На морских свинках, вакцинированных:

- BCG-1, специфическая активность ОСО ППД-Л-2 была в 3 раза выше специфической активности международного стандарта PPD-T;

- BCG Токуо, специфическая активность ОСО ППД-Л-2 была почти в 2,6 раза выше специфической активности международного стандарта PPD-T;

- BCG-1, специфическая активность ОСО ППД-Л-2 была 3,5 раза выше, чем при использовании модели «вакцинация животных BCG Danish»;

- BCG Токуо, специфическая активность ОСО ППД-Л-2 была почти в 3 раза выше, чем при использовании модели «вакцинация животных BCG Danish»;

- BCG Danish, специфическая активность ОСО ППД-Л-2 соответствовала специфической активности международного стандарта PPD-T.

1.2. На животных, зараженных вирулентным штаммом микобактерий туберкулеза или сенсibilизированных убитыми микобактериями туберкулеза, значимые различия в активности туберкулинов отсутствовали.

2. Отмечена зависимость результата испытания от использованных доз сравниваемых препаратов. При сопоставлении разведений 2, 10 и 50 туберкулиновых единиц препаратов:

- специфическая активность ОСО ППД-Л-2 на любой модели вакцинации морских свинок превышала активность PPD-T только на 40–60 %. Такие же результаты получены на модели животных, сенсibilизированных инактивированной культурой *M. tuberculosis* H37 Rv;

- индекс специфической активности 2 ТЕ ОСО ППД-Л-2 относительно 2 IU PPD-T (1st WHO Reference Reagent) на животных, вакцинированных отечественной вакциной БЦЖ, равен

1,02: реакции на препараты были идентичными, индекс специфической активности 5 TE / 5 IU был равен 1,08, а реакции на ОСО ППД-Л-2 статистически значимо выше, чем на международный стандарт.

Приведенные данные свидетельствуют о необходимости использования нескольких моделей сенсibilизации животных при проведении аттестации референс-материала или ОСО относительно международного стандарта, что позволит правильно оценить специфическую активность препарата. Полученные нами результаты указывают на целесообразность корректного выбора модели испытания при необходимости титровать препараты, приготовленные из разных штаммов-продуцентов или с использованием различных технологий получения туберкулинов. Исследования специфической активности ОСО ППД-Л-2 относительно международного стандарта подтвердили высокую стабильность ОСО очищенного туберкулина. При этом необходимо отметить, что, как в свое время иссякли запасы лиофилизата Международного стандарта PPDS, так к настоящему времени значительно уменьшилось количество субстанции ОСО ППД-Л-2. Следует отметить, что ОСО ППД-Л-2 используется на производствах очищенного туберкулина ППД-Л для определения специфической активности порошков-полуфабрикатов (субстанции) очередных осадений туберкулопротеина (набор разведений 5, 25 и 125 TE в 0,1 мл (ОСО ППД-Л-2 42-28-49Б)) и для контроля очередных серий лекарственного препарата туберкулина в стандартном разведении (2 TE) (ОСО ППД-Л-2 42-28-49А). Ежегодное приготовление и контроль разведений ОСО ППД-Л-2 в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, предназначенных для указанных целей, является затратным с точки зрения повышенного расхода субстанции ОСО и проведения дорогостоящего контроля этих разведений по всем тестам, включая определение специфической активности на морских свинках, которые должны длительно (не менее 30 сут) содержаться в виварии до достижения необходимого уровня сенсibilизации. Кроме того, алгоритм ежегодного приготовления и аттестации разведений субстанции ОСО ППД-Л-2 (приготовление мелких навесок субстанции, растворение порошка, приготовление разведений, сенсibilизация животных и проведение контроля специфической активности разведений) является трудоемким и длительным. Алгоритм получения лиофилизированной формы ОСО, рассчитанной на несколько десятилетий, представляет собой однократное разведение субстанции до определенного содержания туберкулина, розлив и лиофильное высушивание единого стандартного пула, последующую аттестацию образцов лиофилизата относительно международного стандарта, что исключает определенное количество возможных ошибок, которые не-

избежны при выполнении ежегодной процедуры. В связи с изложенным представляется целесообразным (аналогично международному стандарту PPDT) изготовление и использование готовых лиофилизированных образцов ОСО ППД-Л-2, содержащих определенное количество туберкулина (например, 10000 или 50000 TE) в емкости. Создание современной формы выпуска отечественного препарата ОСО специфической активности очищенного туберкулина в форме лиофилизата является первостепенной задачей.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

Acknowledgments. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00154-19-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590046-9).

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

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

1. Guld J, Bentzon MW, Bleiker MA, Griep WA, Magnusson M, Waaler H. Standardization of a new batch of purified tuberculin (PPD) intended for International use. *Bull World Health Organ.* 1958;19(5):845–951.
2. Леви ДТ, Яблокова ТБ, Радионова РН, Лянда-Геллер БА. Отработка нового национального стандарта очищенного туберкулина млекопитающих. В кн.: *Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов.* М.; 1979. С. 83–6. [Levy DT, Yablokova TB, Radionova RN, Landa-Geller BA. Development of a new national standard for purified tuberculin mammals. In: *Standarty, shtammy i metody kontrolya bakteriynykh i virusnykh preparatov.* Moscow; 1979. P. 83–6 (In Russ.)]
3. Yamamoto S, Yamamoto T. Historical review of BCG vaccine in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2007;60(6):331–6.
4. Seibert FB, Glen JT. Tuberculin purified protein derivative: preparation and analysis of a large quantity for standard. *Amer Rev Tuberc.* 1941;44:9–25.
5. Слогодская ЛВ. Кожные иммунологические пробы при туберкулезе — история и современность. *Туберкулез и болезни легких.* 2013;(5):1–9. [Slogotskaya LV. Immunological skin tests for tuberculosis — history and modernity. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Disease.* 2013;(5):1–9 (In Russ.)]

Об авторах

Александрова Наталья Владимировна, канд. мед. наук, главный эксперт лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1069-8065>

Леви Диана Тимофеевна, д-р мед. наук, профессор, главный эксперт Управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0783-9282>

Наконечная Алла Витальевна, эксперт 2 категории лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Савина Анна Александровна, эксперт 2 категории лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Поступила 30.01.2019
После доработки 12.02.2019
Принята к публикации 14.02.2019

Authors

Natalia V. Aleksandrova, Candidate of Medical Sciences, Chief Expert of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1069-8065>

Diana T. Levi, Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief Expert of the Division for Expert Evaluation of Antibacterial Medicinal Immunobiological Products' of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products' of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0783-9282>

Alla V. Nakonechnaya, 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

Anna A. Savina, 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

Received 30 January 2019
Revised 12 February 2019
Accepted 14 February 2019