



Порядок приготовления, аттестации и хранения посевной серии вакцинного штамма *Mycobacterium bovis* BCG-I (Russia)

Д.Т. Леви^{1,✉}, Р.И. Луданный², Ю.И. Обухов¹, А.А. Савина¹, А.А. Алесина¹,
Н.В. Александрова¹

¹ 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

² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной клинический противотуберкулезный диспансер» Министерства здравоохранения Московской области, ул. Дубки, д. 7, Мытищи, п. Здравница, Московская обл., 141132, Российская Федерация

✉ Леви Диана Тимофеевна; Levi@expmed.ru

Резюме

До настоящего времени единственным препаратом для массовой активной профилактики туберкулеза среди детей на территории Российской Федерации остается вакцина туберкулезная (БЦЖ). Изготовление промышленных серий вакцины БЦЖ проводят в рамках системы «посевной серии» (seed-lot system), которая регламентирует изготовление вводимой в гражданский оборот вакцины из единой серии посевного материала — лиофилизата *Mycobacterium bovis* BCG. Оценка посевного материала вакцины БЦЖ по показателям качества в отечественных и зарубежных документах представлена в виде отдельных небольших разделов, содержащих краткое описание и/или перечисление показателей и методов контроля. Объединить информацию о получении, аттестации и хранении посевного материала (посевной серии) для производства отечественной вакцины БЦЖ является актуальной задачей. Цель работы — провести сравнительную оценку основных характеристик и методов контроля посевного материала отечественного субштамма *M. bovis* BCG-I (Russia), изложенных в национальных и международных требованиях к вакцинам БЦЖ. Обобщены данные литературы по истории появления субштаммов *M. bovis* BCG, вариативности их характеристик, представлена краткая история происхождения отечественного субштамма BCG-I. Рассмотрены методы контроля, указанные в национальных и международных требованиях к посевному материалу вакцины БЦЖ. Показана практическая возможность провести индикацию субштамма *M. bovis* BCG-I (Russia) с последующим определением генетических свойств, характеризующих его геномную стабильность. Приведены результаты сравнительного анализа данных о стабильности лиофилизатов посевных серий *M. bovis* BCG-I (Russia). Особое внимание уделено биологическим методам контроля посевной серии: определению остаточной вирулентности, включая приживаемость, и иммунобиологическому методу контроля БЦЖ на отсутствие генов, ответственных за выработку антигенов вирулентности (кожные пробы на животных с препаратом Диаскинтест®). Сделан вывод о том, что контроль стабильности генетических и биологических свойств на протяжении всего периода производства и хранения посевной серии позволяет получать вакцину БЦЖ, соответствующую всем требованиям нормативной документации.

Ключевые слова: вакцина БЦЖ; посевная серия; субштамм; система посевных серий (seed-lot system); стабильность генома

Для цитирования: Леви Д.Т., Луданный Р.И., Обухов Ю.И., Савина А.А., Алесина А.А., Александрова Н.В. Порядок приготовления, аттестации и хранения посевной серии вакцинного штамма *Mycobacterium bovis* BCG-I (Russia). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(3):232–240. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-431>

Procedure for preparation, certification, and storage of a seed lot of the *Mycobacterium bovis* BCG-I (Russia) vaccine strain

D.T. Levi¹✉, R.I. Ludanny², Yu.I. Obukhov¹, A.A. Savina¹, A.A. Alesina¹, N.V. Aleksandrova¹

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

² Moscow Regional Clinical Tuberculosis Dispensary, 7 Dubki St., Zdravnitza, Mytishchi, Moscow region 141132, Russian Federation

✉ Diana T. Levi; Levi@expmed.ru

Abstract

To date, the Bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccine has been the only medicinal product for active mass childhood immunisation against tuberculosis in the Russian Federation. Industrial-scale batches of the BCG vaccine are manufactured using a seed-lot system, which provides for producing the vaccine for civil circulation from a single batch of seed material, a lyophilisate of *Mycobacterium bovis* BCG. National and international documents touch upon the evaluation of BCG vaccine seed material in terms of its quality attributes in small separate sections containing brief descriptions and/or lists of attributes and control methods. It is relevant to bring together the information on receipt, certification, and storage of the inoculum (the seed lot) for production of the Russian BCG vaccine. The aim of the study was a comparative assessment of the main characteristics of and control methods for the inoculum of the Russian vaccine strain, *M. bovis* BCG-I, set out in the national and international requirements for BCG vaccines. The article summarises literature data on the history of BCG substrains and the variability of their characteristics and presents a brief account of the origin of the Russian BCG-I substrain. It considers the control methods specified in the national and international requirements for the inoculum for the BCG vaccine. The study demonstrated the practical possibility of identifying BCG down to the substrain level with subsequent determination of genetic properties that characterise genomic stability of the substrain. The article presents the results of the comparative analysis of data on stability of lyophilisates of *M. bovis* BCG-I seed lots (Russia). Particular attention is paid to biological methods for controlling the seed lot (determination of residual virulence, including BCG survival) and the immunobiological method for controlling BCG for the absence of the genes responsible for virulence antigen expression (animal skin tests with Diaskintest®). The authors concluded that the control of stability of genetic and biological properties throughout the entire period of seed lot production and storage makes it possible to obtain BCG vaccines that meet all the regulatory requirements.

Key words: BCG vaccine; seed lot; substrain; seed-lot system; genome stability

For citation: Levi D.T., Ludanny R.I., Obukhov Yu.I., Savina A.A., Alesina A.A., Aleksandrova N.V. Procedure for preparation, certification, and storage of a seed lot of the *Mycobacterium bovis* BCG-I (Russia) vaccine strain. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(3):232–240. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-431>

Введение

Впервые у нас в стране вакцину БЦЖ лиофилизировали в 1943 г., что позволило стабилизировать ее свойства и стандартизовать условия проведения контрольных испытаний [1]. Посевная серия (ПС) для изготовления вакцины БЦЖ для внутрикожного введения была лиофилирована в 1963 г. Эта ПС служила стандартным исходным материалом для получения промышленных серий вакцины БЦЖ в течение 8 лет и лиофилизатов двух очередных ПС (ПС 359 «ш»/1966 г. и ПС 361 «ш»/1992 г.).

С 2008 г. для изготовления вакцины БЦЖ применяется серия 368 «щ» (приготовлена в 2006 г. из ПС 359 «ш»). Номер серии – это очередной номер пассажа (пересева), буква по алфавиту – очередной переосев на питательную среду с бычьей желчью. Таким образом, ПС 368 «щ» – это 368 пассаж *M. bovis* BCG-I, из которых 27 пассажей проведены на среде с бычьей желчью.

В ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России исследовали идентичность и стабильность образцов промышленных серий *M. bovis* BCG-I (Russia), лиофилизированных в 1948, 1950, 1952 и 1954 г., и 4 посевных серий, лиофилизированных в 1971–2006 гг. [2]. В тестах *in vivo* в экспериментах на животных (выживаемость на мышах, остаточная вирулентность и защитное действие на морских свинках) не было обнаружено значимых различий между образцами этих посевных серий. Не выявлены различия и по результатам микробиологических тестов *in vitro*. Полученные результаты подтверждают высокую стабильность изученных свойств субштамма *M. bovis* BCG-I (Russia).

Проведены также исследования методом локус-специфичной ПЦР [3] с использованием 6 праймеров, предоставленных Национальным институтом биологических стандартов и контроля (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC, Великобритания) для международных испытаний дочерних штаммов (субштаммов) BCG. Для оценки длины получаемых в результате амплификации фрагментов применяли маркеры молекулярной массы (50 п.н. или 100 п.н.) и образцы вакцин БЦЖ на основе *M. bovis* BCG-Pasteur 1173p2 (lot 5) и *M. bovis* BCG-Moreau RJ как референтные. В исследовании с серией *M. bovis* BCG-Moreau RJ получены 5 фрагментов амплификации, а *M. bovis* BCG-Pasteur 1173P2 – только 4 таких фрагмента. При ПЦР-анализе продуктов амплификации лиофилизатов ряда отечественных серий вакцины и 4 ПС *M. bovis* BCG-I показано, что паттерны ПЦР-продуктов всех испытуемых образцов были идентичны между собой [2].

Цель работы – провести сравнительную оценку основных характеристик и методов контроля посевного материала отечественного субштамма *M. bovis* BCG-I (Russia), изложенных в национальных и в международных требованиях к вакцинам БЦЖ.

Характеристика субштамма *M. bovis* BCG-I

M. bovis штамм BCG (Bacillus Calmette–Guérin) получен авторами А. Calmette и С. Guérin в 1921 г. в результате 230 пассажей культуры *M. bovis*. Штамм (с рекомендациями по составу среды выращивания, условиям накопления бактериальной массы, длительности культивирования и т.д.) авторы предоставляли всем лабораториям, заинтересованным в приготовлении вакцины против туберкулеза. Производственные лаборатории в процессе изготовления препарата вносили ряд изменений в разработанную авторами технологию культивирования *M. bovis* BCG. Как результат через 25–30 лет появилось несколько субштаммов BCG, которые различались между собой по ряду фенотипических признаков и генетических свойств [4]. Название каждого субштамма включало: род/вид/название штамма с обозначением географического места его получения и/или цифровой код. Например, *M. bovis* BCG Danish 1331, *M. bovis* BCG Tokyo 172 и др.

Генетическая основа аттенуации штамма длительное время не была известна. Только в 1996 г. после публикации данных G.G. Mahairas с соавт. [5], применивших метод геномной гибридизации, стало ясно, что у всех субштаммов BCG отсутствуют одна из трех или все три так называемые области ДНК-различия (DNA region of difference, RD).

В последующем использование большого спектра молекулярно-генетических методов подтвердило, что структурные изменения произошли на геномном уровне. Эти исследования позволили выявить принципиальные отличия субштаммов от стандартного исходного материала, полученного А. Calmette и С. Guérin [6–11] в прошлом веке. Генетическая вариабельность субштаммов BCG определяется крупными геномными различиями, такими как: делетированные участки (RD), однонуклеотидные полиморфизмы и крупные полиморфные участки, а также инсерции, как, например, известная в настоящее время вставка IS6110.

М. Behr [12], оценивая поэтапно отдельные генетические локусы и кластеры генов субштаммов и анализируя происхождение и генетическую вариабельность по количеству копий

IS6110 и наличию/отсутствию mpt64, установил, что наименьшее количество хромосомных делеций имеет кластер *M. bovis* BCG: Japan, Moreau, Russia, отнесенный к наиболее «ранней группе» штаммов *M. bovis* BCG.

Штамм *M. bovis* BCG, полученный Л.А. Тарасевичем в 1924 г. от А. Calmette и С. Guérin, культивировали в России на плотной картофельной среде Павловского. По рекомендации авторов для предупреждения реверсии вирулентности штамма культуру дважды в год пересеивали на среду Павловского, приготовленную с добавлением бычьей желчи.

Результаты работ G.G. Mahairas с соавт. [5] и M. Behr с соавт. [12] актуализировали изучение причин генетической вариабельности субштаммов *M. bovis* BCG. На совещании ВОЗ по вопросам вакцины БЦЖ (Лондон, декабрь 2003) [13] было подчеркнuto, что доказательства молекулярно-генетической изменчивости, выявленной в субштаммах BCG, неоспоримы, а существующие рекомендации ВОЗ к вакцине БЦЖ устарели и подлежат пересмотру. Показана необходимость использования в процессе производства и контроля препарата молекулярно-генетических методов. Внедрение в производство вакцины системы «посевной серии» («seed-lot system») и лиофилизация ПС способствовали принятию мер, направленных на изменение методологии для стабилизации генетически свойств субштаммов. Количество официально принятых ВОЗ субштаммов *M. bovis* BCG фактически сократилось до пяти: BCG-I (Russia), Tokyo 172-1, Danish 1331, Moreau RDJ и Pasteur 1173-P2. На основе этих субштаммов в мире производят 90% применяемых (лицензированных) вакцин.

Если существование различий между субштаммами в настоящее время принято всеми исследователями, то о преимуществе какого-либо из них нет единого мнения [14, 15]. Этот вопрос пока не имеет решения из-за отсутствия единых методов контроля, а также различий в количестве лиц, вакцинированных препаратами, приготовленными из разных субштаммов. Актуальность оценки вариабельности субштаммов *M. bovis* BCG для политики иммунизации остается недостаточно ясной, несмотря на большое количество исследований [5].

В течение последнего десятилетия уделено значительное внимание изучению генома ПС *M. bovis* BCG-I (Russia) [16–19]: полногеномное секвенирование с последующим анализом структуры генома, оценкой его генетической вариабельности и структурных перестроек, которые могут свидетельствовать о его генетической нестабильности. Проведен также фрагментар-

ный анализ, анализ tandemных повторов и дупликаций (variable number of tandem repeats, VNTR), сполиготипирование (spacer oligonucleotide type, spoligotype) и изучение инсерционного элемента IS6110. Результаты исследований позволили установить длину единственной кольцевой хромосомы *M. bovis* BCG-I (Russia), протяженность которой составляла 4370706 п.н. В ходе исследования также дополнительно было установлено наличие делетированного региона RD1 (гены Rv3871–Rv3879c) и дублированного участка DU2 – в геноме ПС *M. bovis* BCG-I, включающего в себя кластер из 20 генов (Rv3299c–Rv3317). Также стоит отметить, что подобные размеры генома имеют ранние субштаммы *M. bovis* BCG – Токуо и Moreau, которые также включены в группу DU2-1 в силу наличия двух повторяющихся элементов IS6110 в области гена *phoP*. Кроме того, дополнительный анализ VNTR локусов [16, 17] показал специфический для генома ПС *M. bovis* BCG-I профиль, что позволяет дифференцировать его от других субштаммов.

По данным Р. Луданного с соавт. [17, 18], расчет генетической дистанции между штаммами, полногеномные последовательности которых размещены в генетическом банке данных, показал наиболее высокий процент гомологии (96,5%) между российским и японским субштаммами *M. bovis* BCG-I.

В работе О. Narvskaya с соавт. [19] представлены данные проведенного в Санкт-Петербурге в 2016 г. сравнительного исследования полногеномного секвенирования российского субштамма *M. bovis* BCG-I и клинических изолятов, выделенных от детей с тяжелыми осложнениями (остеиты) на введение вакцины БЦЖ. Показано, что длительное существование БЦЖ в организме вакцинированного не оказывало влияния на генетические свойства этих микобактерий. По мнению авторов, выявленная вариабельность в профилях экспрессии генов не нарушает стабильность генома субштамма BCG-I. Все девять клинических изолятов были устойчивы к пирозинамиду из-за мутаций в гене *recA*, обеспечивающих высокую *in vivo* резистентность у *M. bovis*.

По мнению Р.М. Keller с соавт. [20], ген *recA*, являющийся ключевым элементом гомологичной рекомбинации, играющий значительную роль в эволюции генома микобактерий, в субштамме *M. bovis* BCG-I (Russia) поврежден. Эта мутация привела к смещению рамки считывания, что, возможно, способствовало генетической стабильности российского субштамма. Однако другие авторы [16, 19] не подтвердили эти данные.

На предприятии НПО «Микроген» проведено полногеномное секвенирование и последующий

сравнительный анализ образцов посевной серии *M. bovis* BCG-I 368 «щ» на всех стадиях получения вакцины. В результате исследования подтверждена подлинность и показана стабильность генома посевной серии от первого высева из исходной ампулы с ПС до готового продукта [21].

В настоящее время, развитие и распространение молекулярно-генетических методов в лабораторной практике позволяет не только идентифицировать субштамм, но и контролировать стабильность его свойств при хранении. Так, при сравнительном исследовании полногеномной копии субштамма *M. bovis* BCG SL222 Sofia, производной (9 генерация) от субштамма *M. bovis* BCG-I Russia (лиофилизация 1971 г.), были обнаружены все характерные генетические особенности, присущие российскому субштамму BCG-I [22, 23], в частности протяженная делеция RD1. Различия в длинах кольцевых хромосом штаммов оказались минимальны: L = 4370705 п.н. [CP_013741, Россия] и L = 4370706 п.н. [CP_064405, София]. Также не нашлось значимых различий в GC-составе, а установленные генетические изменения, отличающие оба штамма, также минимальны (4 SNP) и не превышают 5%. Исследования Т. Stefanova [22], С. Panaiotov с соавт. [23] подтвердили, что, несмотря на многолетнюю, более чем 50-летнюю, историю культивирования, субштамм *M. bovis* BCG-I и его производное *M. bovis* BCG SL222 Sofia генетически стабильны. Сравнительный анализ двух полногеномных копий – BCG-I, seed-lot 368 «щ», Russia [CP_CP013741] и BCG SL222, Sofia [CP_064405] не показал высокий уровень различий.

Описанные однонуклеотидные генетические изменения и небольшие структурные перестройки не превышают, согласно проведенным нами расчетам, 5%. С нашей точки зрения, с учетом того, что фенотипические изменения минимальны и не превышают 5%, строго говорить о выделении болгарского субштамма BCG SL222, Sofia [CP_064405] в отдельный субштамм, возможно, преждевременно. При этом авторы также указывают, что некоторые крупные делеции и инсерции подлежат уточнению, а характер изменений не влияет на фенотипические свойства. Структурные изменения в настоящее время авторами уточняются.

Получение посевной серии субштамма *M. bovis* BCG-I

Очередную посевную серию *M. bovis* BCG-I изготавливают из наиболее ранней посевной серии.

В технологической схеме приготовления посевной серии выделяют следующие этапы:

- высева из ампул с лиофилизатом посевного материала *M. bovis* BCG-I на картофельную среду Павловского (как правило, используется наиболее ранний исходный посевной материал);
- пересев на картофельную среду Павловского;
- накопление культуры *M. bovis* BCG-I – пересев на поверхность жидкой питательной среды ВКЛ (в названии среды указана аббревиатура фамилий исследователей – Вакенгут А.М., Козловская С.Л., Лещинская Е.Н.).

Образующиеся в процессе роста на поверхности питательной среды пленки культуры *M. bovis* BCG-I собирают, гомогенизируют, центрифугируют, разводят до необходимой концентрации, разливают в ампулы, лиофилизируют. Полученная серия *M. bovis* BCG-I после подтверждения на соответствие предусмотренным для ее аттестации тестам является посевной серией для приготовления вакцины БЦЖ.

От точности выполнения всех операций, составляющих технологический процесс, зависит качество конечного продукта [24, 25]. Так, производственный посев БЦЖ проводят в стандартных колбах установленной емкости с одинаковым объемом и составом питательной среды при определенном объеме внесенного инокулята. Такой валидированный подход позволяет стандартизировать условия накопления бактериальной массы в каждой емкости за счет одинаковой площади поверхности роста пленки и аэрации, а также завершать культивирование одновременно во всех емкостях в конце логарифмической фазы роста, когда клетки наиболее устойчивы к процессам гомогенизации и лиофилизации¹.

ПС должна иметь историю происхождения и соответствовать международным и национальным требованиям – это одно из основных условий получения качественного препарата Вакцина туберкулезная (БЦЖ).

Хранят посевной материал при температуре не выше минус 18 °С. Для изготовления промышленных серий вакцины БЦЖ необходимое количество ампул лиофилизата ПС передают 1–2 раза в год предприятию-изготовителю.

Методы контроля посевной серии

Международные и национальные требования имеют рекомендательный характер, оставляя детали проведения каждого из испытаний на рассмотрение национальных органов надзора. Методы контроля каждая страна, производящая вакцину, использует согласно национальным требованиям.

¹ Obayashi Y. Dried BCG vaccine. WHO monograph series, No. 28. Geneva, 1955.

Отечественные требования к посевному материалу представлены в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ XIV)² в виде списка регламентированных показателей с указанием методов контроля. Перечень соответствует Международным требованиям – руководствам ВОЗ³.

Кроме того, только в ГФ РФ XIV включен инновационный иммунобиологический тест с отечественным препаратом Диаскинтест® на специфическую безопасность ПС [26]. Диаскинтест® – рекомбинантный белок, содержащий два связанных между собой антигена – ESAT6 и CFP10, характерных для вирулентных штаммов микобактерий туберкулеза. Данные антигены отсутствуют в вакцинном штамме *M. bovis* BCG, поэтому Диаскинтест® вызывает иммунную реакцию только у морских свинок, сенсibilизированных микобактериями туберкулеза. У сенсibilизированных БЦЖ животных ответные реакции на Диаскинтест® должны отсутствовать.

Согласно отечественным документам на препарат и на посевной материал вакцины БЦЖ требования предъявляются к следующим показателям качества.

Подлинность

Оценивается характерный рост колоний, морфология бактерий; проводятся молекулярно-генетические испытания.

Специфическая активность (жизнеспособность)

Испытания ПС по этому показателю проводят ежегодно. Используют валидированный метод, предложенный ВОЗ⁴. Метод является «золотым стандартом» при контроле вакцины туберкулезной БЦЖ. Оценивают специфическую активность по показателю жизнеспособности при параллельном испытании с действующим ФСО 3.2.00420 «Стандартный образец вакцины туберкулезной (БЦЖ) сухой» (далее ФСО). Через 26–30 сут культивирования трех разведенных посевных материалов и стандарта определяют число колоний БЦЖ, выросших на плотной среде Левенштейна–Йенсена. Рассчитывают число КОЕ в 1 мг бактериальной массы.

Следует отметить, что показатели общего количества бактерий и числа выросших коло-

ний при посеве (КОЕ) не могут быть единичными для вакцин, приготовленных из различных субштаммов, и/или вакцин, различающихся по технологии и методам изготовления⁵. Существенное различие в методах и сроках культивирования субштаммов BCG, объеме и составе питательных сред в разных производственных учреждениях в странах в значительной мере влияют на выход бактериальной массы, устойчивости ее к лиофильному высушиванию, числу жизнеспособных клеток в препарате. Имеют значение размеры клеток микобактерий. Так, размер клеток японского субштамма *M. bovis* BCG (*M. bovis* BCG Tokyo 172-1) значительно меньше размера клеток датского и российского субштаммов, поэтому в 1 мг *M. bovis* BCG Tokyo 172-1 число микобактерий значительно больше, чем в 1 мг бактериальной массы других субштаммов. Все перечисленные факторы могут по совокупности обусловить различия в показателях.

Отсутствие посторонних бактерий и грибов

Испытание проводят методом прямого посева.

Специфическая безопасность

1) Тест на отсутствие вирулентных микобактерий. Вирулентные микобактерии должны отсутствовать.

Испытание проводят биологическим методом: на 10 морских свинок, каждой из которых подкожно вводят по 1,0 мл суспензии, содержащей 5 мг лиофилизата ПС в растворе натрия хлорида 0,9%. Наблюдают за животными в течение 6 недель (к концу срока наблюдения должны оставаться живыми не менее 9 животных). При макроскопическом и микроскопическом исследованиях внутренних органов у всех животных не должно быть признаков туберкулезной инфекции.

2) Иммунобиологический метод. Тест на отсутствие в ПС на основе вакцинного штамма *M. bovis* BCG-I генных участков, ответственных за выработку антигенов ESAT6 и CFP10. Испытание проводят иммунобиологическим методом: находящимся под испытанием на специфическую безопасность 6 морским свинок за сутки до окончания исследования ставят внутрикожные пробы

² Фармакопейная статья 3.3.1.0018.15 Вакцина туберкулезная БЦЖ живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

³ Annex 3. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines. WHO Expert Committee on Biological Standardization, sixty-second report. (WHO technical report series; no. 979). WHO; 2013.

⁴ Designs for *in vitro* assays of BCG products. Appendix 1, 2, 3. WHO/TB/Techn. Guide/6; 1965.

⁵ Annex 3. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines. WHO Expert Committee on Biological Standardization, sixty-second report. (WHO technical report series; no. 979). WHO; 2013.

с 2 ТЕ очищенного туберкулина и с 0,2 мкг препарата Диаскинтест® (аллергена туберкулезного рекомбинантного в стандартном разведении). Ответные реакции учитывают через 24 ч. Реакции на туберкулин должны быть положительными, а на Диаскинтест® – отрицательными, что свидетельствует об отсутствии способности испытуемого образца индуцировать гиперчувствительность замедленного типа к антигенам ESAT6 и CFP10, которые имеются только в вирулентных микобактериях.

Тест на кожную реактогенность

Испытание проводят на 6 морских свинках весом не менее 250 г. В рандомизированном исследовании вводят внутрикожно по 0,1 мл суспензии (1 мг/мл) посевного материала и ее разведения в 10 и 100 раз и ФСО в таких же разведениях. Наблюдают за животными не менее 4 недель. Не должно быть статистически значимых различий в размерах реакций на испытуемые препараты.

Протективные свойства

Испытание проводят в биологическом тесте (на морских свинках). Группе животных (не менее 10 животных массой 250–300 г) вводят ПС. Контрольную группу составляют интактные животные.

Через 2–3 мес. всем животным вводят подкожно в левую паховую область 14-суточную культуру 3 генерации вирулентного штамма *M. tuberculosis*. Животные всех групп подвергаются эвтаназии после гибели от генерализованного туберкулеза 1–2 морских свинок контрольной группы. Поражение внутренних органов и лимфатических узлов оценивают визуально, принимая тотальное поражение за 100%⁶.

Метод подкожного заражения используют при отсутствии установки для аэрогенного заражения.

Контроль проводят параллельно с Международным референс препаратом или с ФСО вакцины БЦЖ.

Остаточная вирулентность (приживаемость)

Остаточная вирулентность может быть оценена:

- 1) на белых мышах при введении суспензии ПС в хвостовую вену (контроль степени размноже-

- ния микобактерий во внутренних органах животного в отдельные временные промежутки);
- 2) на морских свинках (по степени поражения на месте подкожного введения суспензии ПС; по степени распространения поражений во внутренних органах животного).

Выбор метода введения суспензии зависит от вида животного.

Для характеристики динамики размножения микобактерий *in vivo* применяют так называемый индекс поражения (выраженное в логарифмах количество клеток микобактерий в селезенке, легких, печени, костной ткани) в каждый срок наблюдения относительно количества микобактерий, высеванных из органов через 24 ч после иммунизации.

Заключение

ВОЗ рекомендует использовать в качестве исходного материала посевную серию, приготовленную на основе определенного, согласованного национальным органом контроля, *M. bovis* субштамм BCG. В настоящее время в практике производства российской вакцины БЦЖ основой для изготовления препаратов (БЦЖ, БЦЖ-М и Имурон-вак) является посевная серия 368 «щ» (2006 г.). Результаты исследований образцов посевной серии 368 «щ» субштамма *M. bovis* BCG-I (Russia) методами мультиплексной ПЦР и полногеномного секвенирования, периодически выполняемых на этапах производства вакцины БЦЖ, подтверждают подлинность и стабильность материала. Не отмечено изменений и протективных свойств при сопоставлении по этому показателю всех посевных серий, применявшихся для производства отечественной вакцины БЦЖ в течение более 60 лет. В 2021–2022 гг. в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России проведена очередная переаттестация ПС 368 «щ» (1966 г.). Подтверждена стабильность серии по всем показателям, включая остаточную вирулентность и протективные свойства штамма в опытах *in vivo*.

Таким образом, контроль стабильности генетических и биологических свойств на протяжении всего периода производства и хранения посевной серии вакцины БЦЖ обеспечивает получение качественного стабильного по своим свойствам препарата вакцины БЦЖ, соответствующего всем требованиям нормативной документации.

Литература/References

1. Вакенгут АМ, Доликов КЕ, Лещинская ЕН. Способ приготовления сухой вакцины БЦЖ. Авторское

свидетельство № 66674; 1946. [Wakengut AM, Dolikov KE, Leshchinskaya EN. Method of preparing

⁶ Нахимсон ЛИ. Экспериментальное изучение препаратов для противотуберкулезной вакцинации: дис. ... д-ра мед. наук. М.; 1953.

- dry BCG vaccine. Certificate of authorship No. 66674; 1946 (In Russ.)]
2. Леви ДТ, Обухов ЮИ, Александрова НВ, Волкова РА, Эльберт ЕВ, Альварес Фигероа МВ и др. Оценка подлинности и стабильности вакцины БЦЖ методом мультиплексной ПЦР. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016;16(1):49–54. [Levi DT, Obukhov Yul, Aleksandrova NV, Volkova RA, Elbert EV, Alvarez Figueroa MV, et al. Identity and stability assessment of BCG vaccine by multiplex PCR. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(1):49–54 (In Russ.)]
 3. Bedwell J, Kairo SK, Behr MA, Bygraves JA. Identification of sub-strains of BCG vaccine using multiplex PCR. *Vaccine*. 2001;19:2146–51. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00369-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00369-8)
 4. Dubos RJ, Pierce CH. Differential characteristics *in vitro* and *in vivo* of several substrains of BCG. IV. Immunizing effectiveness. *Am Rev Tuberc*. 1956;74(5):699–717.
 5. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol*. 1996;178(5):1274–82. <https://doi.org/10.1128/jb.178.5.1274-1282.1996>
 6. Abdallah AM, Behr MA. Evolution and Strain Variation in BCG. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1019:155–69.
 7. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*. 1999;284(5419):1520–3. <https://doi.org/10.1126/science.284.5419.1520>
 8. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(13):5596–601. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700869104>
 9. Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol*. 1999;32(3):643–55. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01383.x>
 10. Mostowy S, Tsolaki AG, Small PM, Behr MA. The *in vitro* evolution of BCG vaccines. *Vaccine*. 2003;21(27–30):4270–4. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00484-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00484-5)
 11. Salamon H, Kato-Maeda M, Small PM, Drenkow J, Gingeras TR. Detection of deleted genomic DNA using a semiautomated computational analysis of GeneChip data. *Genome Res*. 2000;10(12):2044–54. <https://doi.org/10.1101/gr-gr-1529r>
 12. Behr MA, Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine*. 1999;17(7–8):915–22. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00277-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00277-1)
 13. Corbel MJ, Fruth U, Griffiths E, Knezevic I. Report on a WHO consultation on the characterisation of BCG strains, Imperial College, London 15–16 December 2003. *Vaccine*. 2004;22(21–22):2675–80. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.01.050>
 14. Seki M, Honda I, Fujita I, Yano I, Yamamoto S, Koyama A. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains. *Vaccine*. 2009;27(11):1710–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.034>
 15. Brewer TF, Colditz GA. Relationship between Bacille Calmette–Guérin (BCG) strains and the efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 1995;20(1):126–35. <https://doi.org/10.1093/clinids/20.1.126>
 16. Sotnikova EA, Shitikov EA, Malakhova MV, Kostyukova ES, Ilina EN, Atrasheuskaya AV, et al. Complete genome sequence of *Mycobacterium bovis* strain BCG-I (Russia). *Genome Announc*. 2016;4(2):e00182-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00182-16>
 17. Ludanny R, Alvarez Figueroa M, Levi D, Markelov M, Dedkov V, Aleksandrova N, Shipulin G. Whole-genome sequence of *Mycobacterium bovis* BCG-1 (Russia). *Genome Announc*. 2015;3(6):e01320-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01320-15>
 18. Луданный РИ, Маркелов МЛ, Дедков ВГ, Шипулин ГА, Леви ДТ, Александрова НВ. Сравнительная геномика вакцинного штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia). В: *Сборник научных трудов к 50-летию Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора*. М.: ООО «Издательство «Династия»; 2013. С. 181–182. [Ludanny RI, Markelov ML, Dedkov VG, Shipulin GA, Levi DT, Aleksandrova NV. Comparative genomics of *M. bovis* BCG-1 (Russia) vaccine strain. In: *Collection of Scientific Papers for the 50th Anniversary of the Central Research Institute for Epidemiology of Rosпотребнадзор*. Moscow: Dynasty Publishing House; 2013. P. 181–182 (In Russ.)]
 19. Narvskaya O, Starkova D, Levi D, Alexandrova N, Molchanov V, Chernyaeva E, et al. First insight into the whole-genome sequence variations in *Mycobacterium bovis* BCG-1 (Russia) vaccine seed lots and their progeny clinical isolates from children with BCG-induced adverse events. *BMC Genomics*. 2020;21(1):567. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06973-5>
 20. Keller PM, Böttger EC, Sander P. Tuberculosis vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG Russia is a natural recA mutant. *BMC Microbiol*. 2008;8(1):120. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-120>
 21. Отрашевская ЕВ, Винокурова ВН, Шитиков ЕА, Сотникова ЕА, Перевышина ТА, Колченко СА и др. Изучение генетической стабильности суб-штамма *M. bovis* BCG-1 (Russia) в процессе производства вакцины БЦЖ. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018;2:58–67. [Otrashevskaya EV, Vinokurova VN, Shilikov EA, Sotnikova EA, Perevyshina TA, Kolchenko SA, et al. *M. bovis* BCG-1 (Russia) sub-strain genome stability investigation within the entire production process. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018;2:58–67 (In Russ.)] <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-2-58-67>
 22. Stefanova T. Genetic stability of BCG production in Bulgaria. *Probl Infect Parasit Dis*. 2015;43:30–5.

23. Panaiotov S, Hodzhev Y, Tolchkov V, Tsafarova B, Mihailov A, Stefanova T. Complete genome sequence, genome stability and phylogeny of the vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG SL222 Sofia. *Vaccines*. 2021;9(3):237. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030237>
24. Guallar-Garrido S, Almiñana-Rapún F, Campo-Pérez V, Torrents E, Luquin M, Julián E. BCG substrains change their outermost surface as a function of growth media. *Vaccines*. 2022;10(1):40. <https://doi.org/10.3390/vaccines10010040>
25. Prados-Rosales R, Carreño LJ, Weinrick B, Batista-Gonzalez A, Glatman-Freedman A, Xu J, et al. The type of growth medium affects the presence of a mycobacterial capsule and is associated with differences in protective efficacy of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 2016;214:426–37. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw153>
26. Леви ДТ, Рухамина МЛ. Доклинические исследования препарата «Диаскинтест®». В кн.: *Кожная проба с препаратом «Диаскинтест» – новые возможности идентификации туберкулезной инфекции*. Пальцев МА, ред. М.: Медицина; 2010. С. 65–88. [Levi DT, Ruhamina ML. Preclinical studies of Diaskintest®. In: *Skin test with Diaskintest: new opportunities for the identification of tuberculosis infection*. Paltsev MA, ed. Moscow: Meditsina; 2010. P. 65–88 (In Russ.)]

Вклад авторов. Д.Т. Леви – разработка дизайна исследования, обработка и анализ данных литературы и нормативной документации, написание и критическое обсуждение текста рукописи; Р.И. Луданный – написание текста рукописи, относящегося к вопросам молекулярно-генетических особенностей и стабильности субштаммов *M. bovis* BCG, научное редактирование текста рукописи; Ю.И. Обухов – критическое обсуждение и научное редактирование текста рукописи; А.А. Савина – сбор и обработка данных литературы; А.А. Алесина – сбор и обработка данных литературы; Н.В. Александрова – анализ данных литературы, написание и критическое обсуждение текста рукописи, определение структуры статьи.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Конфликт интересов. Д.Т. Леви является членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Authors' contributions. D.T. Levi—elaboration of the study design, processing and analysis of literature and regulatory data, writing and critical discussion of the text of the manuscript; R.I. Ludannyi—writing of the text of the manuscript on molecular and genetic features and stability of *M. bovis* BCG substrains, scientific editing of the text of the manuscript; Yu.I. Obukhov—critical discussion and scientific editing of the text of the manuscript; A.A. Savina—collection and processing of literature data; A.A. Alesina—collection and processing of literature data; N.V. Aleksandrova—analysis of literature data, writing and critical discussion of the text of the manuscript, outlining of the article.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

Conflict of interest. D.T. Levi is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Леви Диана Тимофеевна, д-р мед. наук, проф. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0783-9282>
Levi@expmed.ru

Луданный Руслан Игоревич, канд. биол. наук. ORCID: 0000-0002-8094-855X
ludannuri@mokptd.ru

Обухов Юрий Иванович. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7729-9800>
Obukhov@expmed.ru

Савина Анна Александровна. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2134-9159>
savina@expmed.ru

Алесина Анна Алексеевна.
alesina@expmed.ru

Александрова Наталья Владимировна, канд. мед. наук. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1069-8065>
aleksandrovaNV@expmed.ru

Diana T. Levi, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0783-9282>
Levi@expmed.ru

Ruslan I. Ludannyi, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: 0000-0002-8094-855X
ludannuri@mokptd.ru

Yuriy I. Obukhov. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7729-9800>
Obukhov@expmed.ru

Anna A. Savina. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2134-9159>
savina@expmed.ru

Anna A. Alesina.
alesina@expmed.ru

Natalia V. Aleksandrova, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1069-8065>
aleksandrovaNV@expmed.ru

Поступила 23.11.2021

После доработки 17.05.2022

Принята к публикации 10.06.2022

Online first 30.08.2022

Received 23 November 2021

Revised 17 May 2022

Accepted 10 June 2022

Online first 30 August 2022