

Исследование остаточной вирулентности и иммунизирующей способности посевных серий *Mycobacterium bovis* BCG-1

Д. Т. Леви, Н. В. Александрова, Ю. И. Обухов

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 15.09.2016 г. Принята к публикации 07.02.2017 г.

Статья посвящена актуальной на сегодняшний день проблеме стабильности системы посевных серий, используемой в стране при производстве вакцин БЦЖ с 1947 г. Данная проблема недостаточно изучена и требует дальнейшего исследования. В ранее проведенной авторами работе использование инновационных (молекулярно-генетических) методов позволило подтвердить соответствие посевных серий БЦЖ-1, применявшихся в стране с 1947 г., международному референс-реагенту (BCG Vaccine of Russian BCG-I sub-strain-International Reference Reagent) по показателю «Подлинность». Настоящая статья включает результаты дальнейшего сравнительного испытания посевных серий БЦЖ-1 367 «щ» (1982) и 368 «щ» (2006). В рамках исследовательской задачи авторы уделили особое внимание таким характеристикам качества, как специфическая активность, остаточная вирулентность (приживаемость), специфическая безопасность (отсутствие вирулентных микобактерий туберкулеза), сенсibiliзирующее действие (по индукции иммуноопосредованной гиперчувствительности замедленного типа к туберкулину) и протективные свойства. Полученные результаты оценки этих серий были близки по своим значениям и не отличались от результатов, полученных при аттестации, проведенной непосредственно после изготовления каждого посевного материала. Эти результаты свидетельствуют о высокой стабильности биологических свойств посевных серий. В статье также представлены данные литературы по исследуемой теме.

Ключевые слова: вакцина БЦЖ; субштаммы БЦЖ; система посевных серий; остаточная вирулентность; приживаемость.

Библиографическое описание: Леви ДТ, Александрова НВ, Обухов ЮИ. Исследование остаточной вирулентности и иммунизирующей способности посевных серий *Mycobacterium bovis* BCG-1. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(1): 48–53.

Несмотря на значительные усилия мирового сообщества, туберкулез продолжает оставаться глобальной проблемой здравоохранения, ведущим инфекционным заболеванием. По данным ВОЗ в 2015 году зарегистрировано 9,6 млн новых заболеваний туберкулезом и 1,5 млн случаев смерти от туберкулеза в мире. Для профилактики туберкулеза используется аттенуированная живая вакцина БЦЖ, созданная французскими учеными А. Кальметтом и К. Гереном в 1921 г. Этой вакциной прививают новорожденных и детей раннего возраста в рамках универсальной программы иммунизации во всем мире, кроме США. Ежегодно ее получают около 100 миллионов детей [1]. При всем существующем в настоящее время разнообразии действующих вакцин против туберкулеза все они имеют один первоисточник — родительский штамм БЦЖ. По настоящее время вакцина БЦЖ является единственным препаратом для профилактики туберкулеза, наиболее широко применяемым и наиболее спорным профилактическим средством. Ряд факторов, включая заболеваемость, иммунный статус, генетические вариации хозяина и штамма БЦЖ, воздействие нетуберкулезных микобактерий, характеристику вакцины, технику прививки и др., влияют на эффективность вакцинации. Известно, что препарат не защищает взрослых от легочного туберкулеза, вызывает значительное число поствакцинальных осложнений [2–4]. С начала нынешнего столетия предприняты широкомасштабные исследования по созданию новых вакцин против туберкулеза взамен вакцины БЦЖ. Около двух десятков вакцин-кандидатов в настоящее время находится на разных стадиях клинических испытаний. Большинство из

них — буст-вакцины, состоящие из фьюжен-антигенов микобактерий и современных адъювантов. Эти вакцины предназначены в основном для применения после вакцинации БЦЖ. Однако ни одна из вакцин-кандидатов пока не продемонстрировала приемлемых результатов.

В 2013 г. ВОЗ переработала и дополнила современными требованиями текст документа «Рекомендации, гарантирующие качество, безопасность и эффективность вакцины БЦЖ» [5], подтвердив необходимость соблюдения системы посевной серии (seed lot system) в производстве препарата. В этом документе рекомендовано использовать для оценки подлинности посевной серии современные молекулярно-генетические методы. Представлены основные требования к посевной серии в seed lot system: колебания остаточной вирулентности БЦЖ (способность приживаться в организме хозяина) не должны выходить за определенные пределы; штамм должен продуцировать относительно высокий уровень иммунологических ответов к антигенам микобактерий туберкулеза и обладать установленными протективными свойствами при заражении вакцинированных животных вирулентным штаммом *Mycobacterium tuberculosis*. С 2009 г. в России для производства туберкулезных вакцин БЦЖ и БЦЖ-М и вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря используется очередная посевная серия субштамма *M. bovis* BCG-1 — серия 368 «щ» (2006)¹. Стабильность этой посевной серии в числе других, сохранившихся в музее ГИСК им. Л. А. Тарасевича, авторы исследовали в ПЦР (полимеразной цепной

¹ В скобках принято указывать год изготовления серии.

реакции) с праймерами, рекомендованными ВОЗ [6]. В рамках этого испытания показана идентичность всех посевных серий БЦЖ-1, лиофилизированных с 1947 г., подтверждена их генетическая стабильность.

Цель работы: в рамках переаттестации серии 368 «щ» субштамма БЦЖ-1 оценить стабильность отечественной системы посевной серии. С этой целью провести сравнительную оценку посевных серий субштамма *M. bovis* BCG-1 по остаточной вирулентности (приживаемости в организме животного), специфической безопасности, сенсibiliзирующей способности (по реакции гиперчувствительности замедленного типа к туберкулину) и протективным свойствам (защитному действию при заражении вирулентным штаммом *M. tuberculosis*).

Материалы и методы

Материалы

1. *Mycobacterium bovis* BCG субштамм BCG-1 (Russia)
 - Посевная серия № 367 «щ» — лиофилизат (1982 г.) 12-дневной культуры 7-й генерации посевной серии 359 «щ» в 1,5 %-ном растворе натрия глутамата моногидрате. Использовалась для изготовления вакцин БЦЖ с 1982 по 2009 гг.
 - Посевная серия № 368 «щ» штамма *M. bovis* BCG-1 — лиофилизат (2006 г.) 12-дневной культуры 7-й генерации посевной серии 359 «щ» в 1,5 %-ном растворе натрия глутамата моногидрате. Используется для изготовления вакцин БЦЖ с 2009 г.
2. ОСО вакцины туберкулезной (БЦЖ) сухой (ОСО 42-28-420-П).
3. ОСО очищенного туберкулина (ОСО ППД-Л-2 42-28-49А-2016).
4. Вакцина БЦЖ-М серия № 679, производства филиала «Медгамал» ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, показатель жизнеспособности 24 млн/мг.
5. Вирулентный тест-штамм *M. tuberculosis* Erdman TMC#107.
6. Питательные среды:
 - яичная среда Левенштейна-Йенсена,
 - картофельная среда Павловского.
7. Животные: белые беспородные мыши массой 16–18 г, морские свинки массой 250–350 г, получены из питомника ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Андреевка».

Методы

1. Приживаемость

А) Для определения остаточной вирулентности проводили исследования по интенсивности вегетирования БЦЖ в селезенке мышей, вводя им в хвостовую вену по 0,001 мг исследуемых образцов БЦЖ в 0,2 мл раствора натрия хлорида 0,9 %. Через 24 часа, 1, 3, 6, 9, 15 и 21 неделю подвергали эвтаназии по 5 животных в каждой группе. Асептически извлекали селезенки, каждую из которых гомогенизировали, ресуспендировали в 5–6 мл 5 %-ного раствора серной кислоты, центрифугировали при 3000g, надосадочную жидкость удаляли. Осадок отмывали средой Сотона и разводили этой средой в зависимости от срока наблюдения в 100 раз (24 ч, 1 и 3 нед.) или в 1000 раз (6, 9, 15 и 21 нед.). По 0,2 мл взвеси селезенки сеяли на 10 пробирок со средой Левенштейна-Йенсена. Посевы инкубировали при температуре (37±1) °С в течение 28 суток, затем подсчитывали число выросших колоний и определяли среднее количество жизнеспособных клеток БЦЖ в селезенке в каждый срок наблюдения. Для харак-

теристики динамики размножения БЦЖ *in vivo* применяли так называемый показатель вегетирования: отношение количества клеток БЦЖ в селезенке в каждый срок наблюдения (выраженное в логарифмах) к количеству микобактерий, высеванных из органов через 24 часа после иммунизации (выраженное в логарифмах).

Б) Тест Йенсена. Основан на сопоставлении размеров местных реакций на внутрикожное (в/к) введение сравнимых препаратов БЦЖ. Лيوфилизаты посевных серий разводили раствором натрия хлорида 0,9 % до концентрации 0,5 мг/мл и вводили по 0,1 мл внутрикожно (в/к) в три точки каждой из 4 морских свинок одного пола весом от 350 до 400 г. Ежедневно, в течение 5 недель, определяли размер кожных реакций на месте введения испытуемых препаратов путем измерения двух взаимоперпендикулярных диаметров кожных инфильтратов. Тест проводили в данной интерпретации в связи с необходимостью статистической обработки результатов. Следует отметить, что результат теста зависит, помимо остаточной вирулентности штамма или ее реверсии, от количества жизнеспособных единиц БЦЖ во вводимой дозе. Поэтому при выполнении теста принято разводить вакцины БЦЖ по количеству жизнеспособных клеток в дозе. Сравнимые посевные серии имели практически одинаковое количество жизнеспособных клеток БЦЖ в 1 мг.

2. Сенсibiliзирующие и защитные (протективные) свойства испытуемых посевных серий изучали на морских свинках массой 250–300 г. Группам животных, по 25 морских свинок в каждой, вводили одну из посевных серий (по 0,01 мг/0,2 мл раствора натрия хлорида 0,9 %) подкожно (п/к) в правую паховую область. Вакцину БЦЖ-М вводили в дозе 0,005 мг/0,2 мл растворителя. Контрольную группу составили 18 морских свинок из той же партии. Животных разбивали на группы по методу случайной выборки:

А) Кожную реакцию гиперчувствительности замедленного типа к туберкулину (ГЗТ к туберкулину) исследовали через 1 и 2,5 месяца после вакцинации путем в/к введения 5 и 25 ТЕ ОСО очищенного туберкулина ППД-Л-2. Ответную реакцию учитывали через 24 часа, измеряя два взаимно перпендикулярных диаметра эритемы, определяли среднюю величину.

Б) После учета реакций на туберкулиновые пробы, поставленные спустя 2,5 месяца после вакцинации, всех животных заражали п/к в левую паховую область 14-дневной культурой 3-й генерации *M. tuberculosis* Erdman на среде Левенштейна-Йенсена (по 0,0001 мг в 0,2 мл раствора натрия хлорида 0,9 %). Животные всех групп были подвергнуты эвтаназии после гибели от генерализованного туберкулеза 2 морских свинок контрольной группы (через 75 сут. после заражения). Поражение внутренних органов и лимфатических узлов оценивали визуально по методу Нахимсон, принимая тотальное поражение за 100. Метод подкожного заражения использован в связи с отсутствием установки для аэрогенного заражения. Метод рутинный, валидированный, обеспечивает стандартные результаты.

Статистическую обработку и оценку полученных в исследованиях данных проводили с использованием параметрических и непараметрических методов статистики [7].

Результаты

Как и при аттестации посевной серии 368 «щ» в 2006–2008 гг., при проведении переаттестации этой серии в качестве препарата сравнения использовали посевную серию 367 «щ» (1982) субштамма БЦЖ-1.

В таблице 1 представлена сравнительная характеристика серий 367 «щ» и 368 «щ» по показателям, предусмотренным спецификацией на вакцину БЦЖ. Анализ результатов показал, что эти посевные серии незначительно различались друг от друга по дисперсности и общему содержанию бактериальных клеток в ампуле, что было продемонстрировано как при оценке фотометрическим методом (0,30–0,37 для серии 367 «щ» и 0,315–0,350 для серии 368 «щ»), так и в пересчете на весовую характеристику — по 2 мг клеток БЦЖ в ампулах. Показатели термостабильности обеих серий были высокими, превышая более чем в 2 раза нижний допустимый лимит, который составляет 25 % от исходного числа жизнеспособных клеток БЦЖ. Половина и более микобактерий БЦЖ оставались жизнеспособными после месяца хранения образцов при температуре 37 °С. Различия показателей жизнеспособности серий также были статистически недоказанными ($P < 0,95$). Кроме того, мониторинг жизнеспособности посевных серий за годы их применения позволяет сделать заключение о высокой стабильности материала в процессе многолетнего хранения (от 30 до 40 млн жизнеспособных клеток в 1 мг БЦЖ).

Остаточную вирулентность серий в опыте по вегетированию БЦЖ в селезенке исследовали на 2 группах белых беспородных мышей, иммунизированных испытуемыми сериями посевного материала. С учетом отсутствия различий в показателях жизнеспособности серий, дозу введения рассчитывали по весовому содержанию клеток БЦЖ — по 0,001 мг на мышшь. Первый посев БЦЖ из селезенки мышей проводили через 24 часа, затем периодически в течение 21 недели. Результаты представлены в таблице 2. Анализ этих результатов показал, что при посеве селезенки мышей через 24 часа после вакцинации в среде Левенштейна-Йенсена вырастает практически одинаковое количество колоний для каждой серии. Логарифм числа колоний снизился вдвое при посеве органа через неделю с последующим нарастанием, достигая пика через 9 недель после вакцинации и постепенно снижаясь к 21 неделе. Спустя этот срок уровень высеваемости клеток БЦЖ из селезенки остается высоким, что свидетельствует

о длительности внутриклеточного размножения микобактерий БЦЖ в этом органе. Статистический анализ представленных результатов показал, что остаточная вирулентность (по показателю вегетирования) серий 367 «щ» и 368 «щ» практически одинакова ($p > 0,05$).

Вторым методом, подтверждающим уровень вегетирования клеток БЦЖ в организме хозяина, является тест Йенсена — внутрикожное введение БЦЖ морским свинкам с длительным наблюдением за развитием местных реакций. Результаты представлены в таблице 3. Дисперсионный анализ полученных результатов показал отсутствие статистически значимых различий между реакциями на введение одинаковых разведений сравниваемых посевных серий. Местные реакции развивались к 6-м суткам и начинали угасать после 5-й недели. Этот тест позволяет оценить способность БЦЖ размножаться в месте введения препарата. При статистической обработке результатов этого теста не было выявлено достоверных различий в размерах реакций на одинаковые дозы двух посевных серий в различные сроки после введения БЦЖ. Тест позволяет оценить не только способность БЦЖ размножаться в месте введения препарата, но и, как полагают, определить возможность реверсии вирулентности. Результат теста зависит также от количества жизнеспособных единиц БЦЖ во вводимой дозе. Однако в нашем случае число жизнеспособных клеток БЦЖ в дозе двух испытуемых серий не имело статистически значимых различий и, таким образом, не могло повлиять на результат исследования.

Специфическую безопасность посевных серий субштамма БЦЖ-1 исследовали, вводя по 100 человеческих доз наиболее чувствительным к туберкулезу животным — морским свинкам. При визуальном исследовании через 7 недель у животных, подвергнутых этаназии, не было отмечено специфических туберкулезных поражений внутренних органов. В основном патологический процесс отмечался в регионарных лимфатических узлах (назоозный лимфаденит) с развитием всех признаков специфического воспаления: творожистого некроза, эпителиоидно-клеточной реакции, гигантоклеточной трансформации с развитием фиброза и перифокального воспаления. У двух

Таблица 1. Результаты сравнительной оценки посевных серий 367 «щ» и 368 «щ»

Серия	Содержание бактерий		Дисперсность	Жизнеспособность, млн/мг	Термостабильность, %	Растворимость, гомогенность
	мг	ОП*				
367 «щ»	2	0,30–0,37	1,7–1,9	32–44	48	Соответствует НД
368 «щ»	2	0,315–0,350	1,6–1,7	35–45	65	Соответствует НД

* ОП — показатель оптической плотности.

Таблица 2. Интенсивность вегетирования БЦЖ в селезенке мышей, иммунизированных испытуемыми сериями посевного материала

Серия	Интенсивность вегетирования БЦЖ в селезенке мышей в различные сроки после вакцинации						
	24 часа	1 нед.	3 нед.	6 нед.	9 нед.	15 нед.	21 нед.
367 «щ»	1,2±0,1	0,5±0,2	0,9±0,2	2,5±0,2	2,8±0,3	2,1±0,4	2,2±0,2
368 «щ»	1,5±0,1	0,5±0,2	1,0±0,2	2,1±0,1	2,3±0,3	1,8±0,4	1,7±0,2
Достоверность различий (p)	=0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Таблица 3. Результаты теста Йенсена у морских свинок при введении дозы 0,05 мг/0,1 мл посевных серий

Посевной материал	368 «щ»					367 «щ»				
	1 нед.	2 нед.	3 нед.	4 нед.	5 нед.	1 нед.	2 нед.	3 нед.	4 нед.	5 нед.
Срок после введения, нед.	1 нед.	2 нед.	3 нед.	4 нед.	5 нед.	1 нед.	2 нед.	3 нед.	4 нед.	5 нед.
Размер, мм	5,5±1,1	5,9±0,6	5,7±0,8	5,8±0,6	5,1±0,6	6,1±1,0	6,6±0,7	6,6±0,6	6,7±0,4	6,0±0,4

морских свинок 1 и 2 группы отмечены признаки специфической реакции в легких с образованием единичных мелких узелков, очагов эпителиоидно-клеточной трансформации и единичных гигантских многоядерных клеток. В дальнейшем со временем такая реакция на БЦЖ, свидетельствующая об остаточной вирулентности, имеет обратное развитие. Проведенные исследования не выявили существенных различий в органах и лимфатических узлах морских свинок в ответ на введение испытуемой посевной серии и серии сравнения.

Иммуногенность посевного материала 368 «щ» исследовали на морских свинках, проводя сравнение с серией 367 «щ» и с коммерческой серией вакцины БЦЖ-М, приготовленной из посевной серии 368 «щ». Вводимая животным весовая доза была в 2 раза меньше, а количество жизнеспособных клеток БЦЖ серии вакцины туберкулезной для щадящей первичной иммунизации (БЦЖ-М) в 3 раза меньше, чем при вакцинации посевными сериями.

Сенсибилизирующие свойства препаратов оценивали по развитию ГЗТ к очищенному туберкулину (ОСО ППД-Л-2) у вакцинированных морских свинок через 1 и 2,5 месяца после вакцинации. Результаты этого испытания представлены в таблице 4. Анализ представленных результатов показал, что через месяц после вакцинации животные всех групп реагировали как на 25 ТЕ, так и на 5 ТЕ ОСО ППД-Л-2. Ответные реакции ГЗТ на туберкулин у животных в сравниваемых группах были близки по своим значениям. На 5 ТЕ ППД-Л-2 через 1 месяц после вакцинации посевными сериями ответные реакции были наибольшими у животных, вакцинированных серией 367 «щ» (9,48 мм), и наименьшими — у вакцинированных БЦЖ-М (8,10 мм). У вакцинированных посевной серией 368 «щ» значение ответной реакции составило 8,57 мм. Однако статистической значимости различий в уровне ГЗТ доказать не удалось. Через 2,5 месяца средние реакции ГЗТ на 5 ТЕ туберкулина в каждой группе увеличивались и составляли 10,80; 11,54 и 11,50 мм соответственно ($p < 0,05$). Размеры ответных реакций на 25 ТЕ были статистически значимо большими как через 1 мес. (11,5; 11,8 и 11,5 мм), так и через 2,5 мес. (14,5, 14,0 и 14,3 мм), чем на 5 ТЕ ($p < 0,05$).

Дисперсионный анализ полученных материалов показал отсутствие статистически значимых различий между ГЗТ к туберкулину в ответ на введение исследуемых препаратов, сенсибилизирующую способность которых следует признать одинаковой.

Протективные свойства исследуемых посевных серий БЦЖ серии 679 вакцины БЦЖ-М оценивали по способности задерживать развитие туберкулеза у морских свинок через 2,5 месяца после вакцинации. Животных вакцинированных и контрольных групп заражали тест-штаммом *M. tuberculosis* Erdman. Вскрытие животных всех групп проводили после гибели от генерализованного туберкулеза 2 морских свинок контрольной группы. Результаты испытания представлены в таблице 5.

В группах животных, вакцинированных двумя сериями посевного материала БЦЖ и коммерческой серией вакцины БЦЖ-М средние индексы поражения находились на одинаковом уровне ($p > 0,05$), различаясь незначительно (27,0; 24,7 и 25,6 соответственно). У вакцинированных животных туберкулезные поражения были ограничены лимфатическими узлами и единичными мелкими специфическими узелками в отдельных органах (индексы поражения от 0 до 30). Все животные контрольной группы имели значительные туберкулезные поражения не только в лимфатических узлах, но и в селезенке, печени и легких. Эти поражения были множественными, туберкулезные узелки, как правило, средними или крупными (индексы поражения от 30 до 90). Средний индекс поражения морских свинок контрольной группы составлял 72,6, что статистически значимо выше, чем у вакцинированных животных. Половинная вакцинирующая доза (вакцина БЦЖ-М) задерживала развитие туберкулеза у животных на уровне посевных серий — индекс поражения 25,6. Эти данные еще раз подтвердили правомерность проведенного ранее снижения верхнего лимита жизнеспособности коммерческих серий вакцины БЦЖ и БЦЖ-М с целью снижения поствакцинальных осложнений [8].

Обсуждение

Исследуя историю происхождения и полигенность 13 субштаммов БЦЖ, М. А. Behr и Р. М. Small [9, 10] показали, что субштаммы БЦЖ значительно отличаются от исходного

Таблица 4. Интенсивность ГЗТ к туберкулину у морских свинок, вакцинированных различными посевными сериями

Серия	Размер туберкулиновых реакций (мм) после вакцинации через			
	1 месяц		2,5 месяца	
	на 5 ТЕ	на 25 ТЕ	на 5 ТЕ	на 25 ТЕ
367 «щ»	9,48±0,6	11,8±0,7	11,54±0,7	14,56±0,8
368 «щ»	8,67±0,6	11,6±0,5	10,8±0,7	14,0±0,6
679 БЦЖ-М	8,1±0,7	11,5±0,7	10,8±0,5	14,3±0,6
Достоверность различий (p)	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Таблица 5. Результат определения протективных свойств испытуемых препаратов на морских свинках

Серия препарата	Доза БЦЖ мг/жк*	Количество животных с индексом поражения				Число животных в группе	Средний индекс поражения
		0–10	20–30	40–60	80–100		
367 «щ»	0,1/3500000	4	13	6	0	24	27,0
368 «щ»	0,1/3500000	8	11	5	0	24	24,7
679 «БЦЖ-М»	0,05/1200000	6	11	4	1	23	25,6
Контроль	0	0	1	4	12	17	72,6

* жк — жизнеспособные клетки БЦЖ.

штамма *M. bovis* BCG по антигенному составу. Они разделили их на три группы по количеству копий IS6110 и наличию или отсутствию *mpt64* при анализе в ПЦР. Субштаммы BCG-Russia, BCG-Japan, BCG-Moreau, так же как и оригинальный штамм BCG, имели *mpt64* и 2 копии IS6110. Эта группа штаммов была получена от французских исследователей в 1924–1925 гг. Другая группа, с делецией 1 копии IS6110, была получена в 1925–1926 гг. В нее вошли BCG-Sweden и BCG-Birkhaug. Третья группа, включившая наибольшее количество субштаммов, потеряла *mpt64* и по одной копии IS6110. Эти штаммы были получены в 1926–1931 гг. В нее включены субштаммы BCG-Denmark BCG и производные от него (BCG-Prague, BCG-Glaxo), BCG-Phipps, BCG-Tice, BCG-Flappier и производный от него (BCG-Connaught), BCG-Pasteur.

Эти данные затем были подтверждены и другими авторами [11, 12]. Показано также, что существует несколько вариантов некоторых субштаммов, например, 4 варианта французского, 2–3 варианта датского и японского субштаммов БЦЖ. Эти варианты субштаммов также различаются между собой по генетической и филогенетической характеристике. Все это разнообразие субштаммов привело к тому, что с 2010 по 2013 г. в результате коллаборативных исследований ВОЗ зарегистрировала 3 наиболее широко используемых субштамма БЦЖ в качестве международных референс-реагентов для производства вакцин БЦЖ:

- BCG Vaccine of Danish 1331 sub-strain (1st WHO Reference Reagent) International Reference Reagent;
- BCG Vaccine of Tokyo 172 sub-strain (1st WHO Reference Reagent) International Reference Reagent;
- BCG Vaccine of Russian BCG-I sub-strain (1st WHO Reference Reagent) International Reference Reagent;

В последующем к регистрации ВОЗ также был принят субштамм BCG-Moreau.

Ранее, на 1 этапе данных исследований, нами были использованы молекулярно-генетические методы для сравнительной оценки отечественных посевных серий (с 1947 по 2006 г.) с международным референс-реагентом BCG Vaccine of Russian BCG-I sub-strain (1st WHO Reference Reagent) International Reference Reagent. Установлена полная идентичность лиофилизатов посевных серий как между собой, так и с международным референс-реагентом [6].

В данном испытании серия 368 «щ» субштамма БЦЖ-1 исследована по дополнительным тестам, рекомендованным ВОЗ. При изучении остаточной вирулентности (вегетирование в организме мышей и морских свинок) и при оценке иммуногенности субштамма БЦЖ-1 (по способности вызывать иммуноопосредованную ГЗТ к туберкулину и по протективной способности) в качестве препарата сравнения использовали предыдущую серию посевного материала 367 «щ». Результаты показали отсутствие каких-либо значимых различий в указанных показателях между сравниваемыми посевными сериями. Серия 367 «щ», так же как и серия 368 «щ», приготовлена из посевной серии 359 «ш», лиофилизированной в 1966 г. На основании полученных результатов продемонстрирована стабильность свойств субштамма БЦЖ-1 и подтверждена адекватность алгоритма изготовления посевных серий.

Следует особо отметить результаты исследования протективных свойств посевных серий БЦЖ-1 с использованием дополнительной группы морских свинок, вакцинированных производственной (коммерческой) серией вакцины БЦЖ-М, изготовленной из посевного материала 368 «щ». Весовая доза вакцинации этим препаратом была равна половине дозы вакцинации посевными сериями, а число жизнеспособных клеток БЦЖ в ней составило толь-

ко 1/3 дозы посевных серий. Индексы поражения животных, вакцинированных посевными сериями и вакциной БЦЖ-М, были практически одинаковыми: 27,0; 24,7 и 25,6 соответственно при тяжелом тотальном поражении 70 % животных контрольной группы (средний индекс поражения животных туберкулезом в группе — 72,0). Полученные данные в очередной раз подтвердили правомерность и своевременность снижения верхних границ показателя жизнеспособных клеток в туберкулезных вакцинах, которое было внедрено с 2012 года в производство этих препаратов с целью снижения числа поствакцинальных осложнений.

Заключение

Результаты переаттестации посевной серии 368 «щ» субштамма БЦЖ-1 показали, что эта серия практически не отличается по качеству от серии 367 «щ», использовавшейся в течение 20–25 лет для производства вакцины туберкулезной (БЦЖ и БЦЖ-М). Образцы этих серий имели одинаковое содержание бакмассы в ампуле как по показателю оптической плотности, так и расчетное по весу. Показано, что посевные серии незначительно различались по дисперсности и содержанию жизнеспособных клеток в 1 мг препарата, термостабильности, вегетированию в органах животных, специфической безопасности при введении 100-кратной человеческой дозы морским свинкам, способности индуцировать ГЗТ к туберкулину и по защитной (протективной) способности. Таким образом, полученные в результате исследования данные показали, что как посевная серия 368 «щ» (2006), так и посевная серия 367 «щ» (1982), приготовленная около 35 лет назад, до настоящего времени стабильно сохраняют свои свойства. Это подтверждает адекватность и стабильность установленного в стране порядка изготовления, аттестации и хранения посевных серий субштамма *M. bovis* BCG-1 (Russia).

Литература

1. Аксенова ВА, Леви ДТ. Туберкулезные вакцины / Вакцины и вакцинация. Национальное руководство. Зверев ВВ, Семенов БФ, Хаитов РМ, ред. М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2011. С. 371–411.
2. Roy A, Eisenhut M, Harris RJ, Rodrigues LC, Sridhar S, Habermann S, et al. Effect of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* infection in children: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2014; 349: g4643.
3. Black GF, Weir RE, Floyd S, Bliss L, Wardorff DK, Crampin AC, et al. BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised controlled studies. *Lancet* 2002; 359(9315): 1393–401.
4. Мушкин АЮ. БЦЖ-оститы. Диагностика, критерии постановки и лечение. *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. 2004; (1): 21–3.
5. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines (Annex 3). WHO Technical Report Series No. 979, 2013.
6. 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.
7. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999.
8. ФС. 3.3.1.0018.15. Вакцина туберкулезная БЦЖ живая. Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 3. М.; 2015. С. 917–22. Available from: <http://femb.ru/feml>.
9. Behr MA, Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 1999; 17(7–8): 915–22.
10. Behr MA. Correlation between BCG genomics and protective efficacy. *Scand J Infect Dis*. 2001; 33(4): 249–52.
11. 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.

12. Seki M, Honda I, Fujita I, Yano I, Yamamoto S, Koyama A. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmet-

te-Guerin (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains. *Vaccine* 2009; 27(11): 1710–6.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.

Леви Диана Тимофеевна. Главный эксперт управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Александрова Наталья Владимировна. Главный эксперт лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Обухов Юрий Иванович. Начальник управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП.

Адрес для переписки: Леви Диана Тимофеевна; Levi@expmed.ru

Determination of residual virulence and immunogenicity of *Mycobacterium bovis* BCG-1 seed lots

D. T. Levi, N. V. Aleksandrova, Yu. I. Obukhov

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The article is devoted to a challenging issue of stability of seed lot systems that have been used in Russia since 1947 to produce BCG vaccines. This problem is underexplored and needs further investigation. In an earlier study the authors of the article used innovative (molecular genetic) methods to demonstrate the conformity of BCG-1 seed lots used in Russia to the international reference reagent (*BCG Vaccine of Russian BCG-1 sub-strain-International Reference Reagent*) in terms of «Identification». This article lays out the results of new comparative studies of BCG-1 367 «щ» (1982) and 368 «щ» (2006). During the study special emphasis was put on such quality parameters as residual virulence (survival), specific safety (absence of virulent mycobacteria tuberculosis), sensitization effect (by induction of immune-mediated delayed hypersensitivity to tuberculin), and protective effects. The values obtained in the batches evaluation were very close and did not differ from the results obtained during certification performed just after the production of each seed lot. These results testify to the high degree of stability of the seed lots biological properties. The article also cites literary sources that address the issue in question.

Key words: BCG vaccine; BCG substrains; seed lot system; residual virulence; survival.

For citation: Levi DT, Aleksandrova NV, Obukhov Yul. Determination of residual virulence and immunogenicity of *Mycobacterium bovis* BCG-1 seed lots. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(1): 48–53.

References

- Aksenova VA, Levi DT. TB vaccines/Vaccines and vaccination. *National manual*. Zverev VV, Semenov BF, Haitov RM, eds. Moscow: GEOTAR-Media, 2011. P. 371–411 (in Russian).
- Roy A, Eisenhut M, Harris RJ, Rodrigues LC, Sridhar S, Habermann S, et al. Effect of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* infection in children: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2014; 349: g4643.
- Black GF, Weir RE, Floyd S, Bliss L, Warndorff DK, Crampin AC, et al. BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised controlled studies. *Lancet* 2002; 359(9315): 1393–401.
- Mushkin AYU. BCG osteitis: diagnosis and treatment. *Problems of Tuberculosis and Lung Diseases* 2004; (1): 21–3 (in Russian).
- Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines (Annex 3). *WHO Technical Report Series No. 979*, 2013.
- Levi DT, Obukhov Yul, Aleksandrova NV, Volkova RA, Elbert EV, Alvarez Figeroa MV, et al. Identity and stability assessment of BCG vaccine by multiplex PCR. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(1): 49–54 (in Russian).
- Glantz SA. *Primer of Biostatistics*. Moscow: Praktika; 1999 (in Russian).
- ФС. 3.3.1.0018.15. *Mycobacterium bovis* BCG vaccine (monograph). *The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th edition. V. 3*. Moscow; 2015. P. 917–22. Available from: <http://femb.ru/feml> (in Russian).
- Behr MA, Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 1999; 17(7–8): 915–22.
- Behr MA. Correlation between BCG genomics and protective efficacy. *Scand J Infect Dis*. 2001; 33(4): 249–52.
- 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.
- Seki M, Honda I, Fujita I, Yano I, Yamamoto S, Koyama A. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains. *Vaccine* 2009; 27(11): 1710–6.

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Levi DT. Chief expert of the Division for Expert Evaluation of Antibacterial Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences, professor.

Aleksandrova NV. Chief expert of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Obukhov Yul. Head of the Division for Expert Evaluation of Antibacterial Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products.