

Стабильность отраслевого стандартного образца вакцины туберкулезной (БЦЖ)

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

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

Стандартный образец вакцины туберкулезной (БЦЖ), аттестованный и зарегистрированный в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (ОСО 42-28-420), используют в качестве препарата сравнения при контроле вакцины туберкулезной БЦЖ и БЦЖ-М. Стабильность свойств ОСО позволяет минимизировать ошибки при оценке показателей качества этих лекарственных средств, что и определяет целесообразность его применения. Срок годности ОСО вакцины БЦЖ не более 2 лет в условиях хранения образцов при температуре от 2 до 8 °С. Представляется целесообразным использование в качестве ОСО одной и той же серии в течение более длительного времени. В литературе имеются данные о возможности увеличения срока годности вакцины БЦЖ при хранении препарата при низких температурах. Однако в связи со значительными фенотипическими и генотипическими различиями между субштаммами БЦЖ эти данные не могут быть экстраполированы на вакцину из российского субштамма *Mycobacterium bovis* BCG-I без проведения соответствующих испытаний. **Цель работы:** изучение возможности увеличения срока годности отраслевого стандартного образца вакцины туберкулезной за счет изменения условий температурного режима его хранения. **Материалы и методы:** изучение влияния низких значений температуры на стабильность ОСО 42-28-420 было проведено на производственных сериях вакцины туберкулезной, которые по всем параметрам соответствовали качеству вакцин — кандидатов в ОСО. Образцы 6 серий ОСО, приготовленных с 2014 по 2019 г. включительно, хранили при температуре минус (20 ± 1) °С, проводя мониторинг стабильности их качества по показателям «Специфическая активность (жизнеспособность)», «Общее содержание бактерий» и «Дисперсность» в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Результаты оценивали относительно базовых, полученных при аттестации каждой серии. **Результаты:** установлено, что при хранении ОСО 42-28-420 в течение 5 лет в условиях низких значений температуры исследуемые показатели с вероятностью более 95% не отличались от исходных. **Выводы:** полученные результаты являются основанием для увеличения срока годности ОСО 42-28-420 до 4 лет в регламентируемых условиях хранения при температуре минус (20 ± 1) °С.

Ключевые слова: ОСО вакцины БЦЖ; стабильность ОСО; срок годности; аттестуемые показатели; международные стандартные образцы

Для цитирования: Александрова НВ, Савина АА, Наконечная АВ, Леви ДТ. Стабильность отраслевого стандартного образца вакцины туберкулезной (БЦЖ). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(3):187–192. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-187-192>

Контактное лицо: Леви Диана Тимофеевна; Levi@expmed.ru

Stability of the Industrial Reference Standard of Tuberculosis Vaccine (BCG)

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

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

The industrial reference standard of tuberculosis (BCG) vaccine (IRS), certified and registered by the Federal State Budgetary Institution “Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products” of the Ministry of Health of the Russian Federation (OSO 42-28-420), is used as a reference product in quality control of tuberculosis vaccines BCG and BCG-M. The IRS is a useful means of quality control of these products, as the stability of its properties helps to minimise errors during quality evaluation. The shelf life of the BCG vaccine IRS is not more than 2 years if stored at 2–8 °C. It is likely that a vaccine batch could be used as the IRS for a longer period of time. The literature data suggest that the shelf life of a BCG vaccine can be prolonged if it is stored at low temperatures. However, due to significant phenotypic and genotypic differences between BCG sub-strains, the extrapolation of these data to the vaccine produced from the Russian *Mycobacterium bovis* BCG-I sub-strain requires appropriate testing. **The aim of the study** was to analyse the possibility of increasing the shelf life of the tuberculosis vaccine IRS by changing the storage temperature. **Materials and methods:** the effect of low temperatures on the stability of OSO 42-28-420 was studied in commercial batches of tuberculosis vaccine which met all the quality requirements for candidate IRSs. Samples from 6 IRS batches produced from 2014 through 2019 were stored at $-(20 \pm 1)$ °C. The stability of their quality characteristics, namely “Specific activity (viability)”, “Total bacterial count”, and “Dispersibility”, was monitored according to the recommendations of the World Health Organization. The obtained data were evaluated relative to the baseline data obtained during certification of each batch. **Results:** it was demonstrated that there was more than 95 percent probability that the tested parameters would not differ from the initial data if OSO 42-28-420 samples were stored at a low temperature for 5 years. **Conclusions:** the

results obtained support the prolongation of the OSO 42-28-420 shelf life up to 4 years under the recommended storage conditions at $(-20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Key words: BCG vaccine IRS; IRS stability; shelf life; certified characteristics; international reference standards

For citation: Aleksandrova NV, Savina AA, Nakonechnaya AV, Levi DT. Stability of the industrial reference standard of tuberculosis vaccine (BCG). *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(3):187–192. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-187-192>

Corresponding author: Diana T. Levi; Levi@expmed.ru

В настоящее время применение стандартных образцов и стандартных материалов является обязательным для многих процедур при контроле качества иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП). Основными (первичными) стандартами, которые применяют во всем мире, являются международные стандартные образцы (МСО) — The First WHO International Reference Preparation. МСО утверждаются технической комиссией Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). Стандартные образцы (СО), аттестованные относительно МСО, — это вторичные (региональные, государственные) стандарты.

В связи с различиями между субштаммами БЦЖ создание единого МСО для вакцин туберкулезных (БЦЖ) было и остается трудной и до настоящего времени не вполне решенной задачей. Первый Международный эталонный препарат ВОЗ (International Reference Preparation for BCG vaccine, IRP) был введен в практику контроля вакцины БЦЖ в 1965 г.¹ Однако в начале 2000-х гг. уменьшение запасов IRP до критического количества и двукратное снижение специфической активности этого стандарта потребовали его замены.

Специфическая активность туберкулезных вакцин зависит в основном от характеристики субштамма БЦЖ и технологии изготовления препарата. «Маркером» специфической активности вакцин БЦЖ является показатель жизнеспособности серии, который оценивают по количеству колоний, выросших при посевах трех разведений препарата на селективную плотную питательную среду. Данный метод оценки принято называть тестом КОЕ (колониеобразующие единицы). Этот количественный тест используют все производители вакцины и национальные контрольные лаборатории для характеристики качества препарата. Однако существующие отличия в размерах микобактериальных клеток БЦЖ, используемых при производстве вакцин из разных субштаммов, препятствуют введению единых для всех вакцин значимых нормативных показателей: «Общее содержание бактерий» и «Специфическая активность».

Для преодоления разногласий в вопросах стандартизации вакцин БЦЖ ВОЗ в 2009 г. инициировала приготовление в качестве МСО серий из трех субштаммов БЦЖ, наиболее часто используемых в мировой практике для производства туберкулезных вакцин [1]. По заказу ВОЗ в Japan BCG Laboratory были изготовлены серии вакцины из датского 1331 и японского 172-1 субштаммов БЦЖ. Серия вакцины из субштамма BCG-I Russia была приготовлена на предприятии Национального центра инфекционных и паразитарных болезней (Болгария)². Образцы всех серий-кандидатов направили в 11 лабораторий 9 стран для оценки по показателям «Специфическая активность» (по количеству жизнеспособных микобактерий БЦЖ — тест КОЕ) и «Подлинность» (молекулярно-биологическим методом).

На основании результатов международного исследования специализированная комиссия ВОЗ рекомендовала утвердить

серии из указанных субштаммов БЦЖ в качестве первичных международных эталонных реагентов (МСО) с установленным содержанием КОЕ³. В 2013 г. к этим трем МСО была присоединена серия из субштамма *Mycobacterium bovis* BCG Moreau-RJ (субштамм Моро) [2].

Содержание жизнеспособных микобактерий БЦЖ в ампуле для серии из субштамма БЦЖ (Дания) составило от 3,37 до 11,22 млн ($X = 7,29$ млн); БЦЖ-I (Россия) — от 0,95 до 5,83 млн ($X = 3,39$ млн); БЦЖ 172 (Токио, Япония) — от 29,6 до 69,14 млн ($X = 49,37$ млн) на ампулу соответственно, при расширенной неопределенности (достоверность 95%) [2]. Из-за относительно больших различий в содержании КОЕ в ампулах отдельных МСО эти референс-реагенты рекомендовано использовать не в качестве стандартов для калибровки, а в качестве препаратов сличения (компараторов) для оценки методики контроля аттестуемых показателей. МСО рекомендовано также использовать в качестве эталонов при оценке подлинности штамма-производителя методами молекулярной биологии.

Хранит и распространяет МСО Национальный институт биологических стандартов и контроля (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC, Великобритания). Согласно рекомендации ВОЗ Национальные регуляторные органы и предприятия-изготовители разрабатывают вторичные (региональные, государственные) стандарты, используя с этой целью одну из промышленных серий препарата⁴. В качестве национального (вторичного) СО при контроле иммунобиологических лекарственных препаратов в России приняты отраслевые стандартные образцы (ОСО).

ОСО вакцины туберкулезной (БЦЖ) зарегистрирован в реестре ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России под номером ОСО 42-28-420-П. Буква «П» в номере — это год утверждения/действия ОСО. ОСО 42-28-420-П применяют в качестве препарата сравнения при контроле вакцины туберкулезной (БЦЖ/БЦЖ-М) и препаратов для иммунотерапии рака мочевого пузыря (Имурон-вак (Вакцина БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря) и Уро-БЦЖ медак) по трем аттестуемым показателям качества: «Специфическая активность», «Общее содержание бактерий» и «Дисперсность».

Стабильность свойств ОСО является важнейшим показателем качества, определяющим возможность его применения. Срок годности ОСО 42-28-420-П ограничен: 1 год с последующей переаттестацией еще на 1 год. Несомненно, использование СО стабильного в течение максимально длительного срока позволяет минимизировать ошибки при оценке показателей качества производственных серий вакцины, что подтверждает целесообразность применения одной и той же серии ОСО в течение длительного срока.

Цель работы — изучение возможности увеличения срока годности отраслевого стандартного образца вакцины туберкулезной за счет изменения условий температурного режима

¹ WHO Expert committee on biological standardization. WHO Technical Report Series 329; 1966.

² WHO Expert committee on biological standardization. WHO Technical Report Series 978; 2010.

³ Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines. In: WHO Expert committee on biological standardization. WHO Technical Report Series 979; 2011. P. 137–86.

⁴ Там же.

Таблица 1. Серии ОСО, использованные при производстве и контроле вакцин БЦЖ с 2014 по 2019 г.
Table 1. IRS batches used for production and quality control of BCG vaccines from 2014 through 2019

Наименование ОСО IRS code	Номер серии ОСО (год аттестации/действия) IRS batch number (year of certification/use)	Длительность хранения, лет Storage period, years
ОСО 42-28-420-2014	14 (2014)	6
ОСО 42-28-420-2015	15 (2015)	5
ОСО 42-28-420-2016	16 (2016)	4
ОСО 42-28-420-2017	17 (2017)	3
ОСО 42-28-420-2018	18 (2018)	2
ОСО 42-28-420-2019	19 (2019)	1

Таблица 2. Алгоритм проведения испытания (рекомендованный ВОЗ)
Table 2. Test procedure (recommended by the World Health Organization)

Разведение Dilution ratio	Номер разведения Dilution number	Объем, мл Volume, mL	
		микробной взвеси microbial suspension	раствора натрия хлорида 0,9% 0.9% sodium chloride solution
1:50	1	2,0 основной взвеси 2.0 of the main suspension	48,0
1:2500	2	2,0 (из № 1) 2.0 (from No. 1)	98,0
1:40000	3	2,0 (из № 2) 2.0 (from No. 2)	30,0
1:80000	4	2,0 (из № 2) 2.0 (from No. 2)	62,0
1:160000	5	2,0 (из № 2) 2.0 (from No. 2)	126,0

его хранения. В задачу исследования входило изучение долговременной стабильности по критериям приемлемости показателей «Специфическая активность», «Общее содержание бактерий» и «Дисперсность» при хранении серий ОСО в условиях низкой температуры.

Материалы и методы

Материалы

1. Кандидаты в ОСО — это часть (по 1000 ампул) серий вакцины туберкулезной, изготовленных в период с 2014 по 2019 г. ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России из посевной серии 368щ *Mycobacterium bovis*, субштамм BCG-I (Россия). Форма выпуска — лиофилизат, по 0,5 мг в ампуле. Эти кандидаты для ОСО были выбраны из готовых к выпуску серий туберкулезной вакцины, соответствующих требованиям нормативной документации по всем показателям качества. При этом одним из основных критериев отбора являлась стандартность показателя «Общее содержание бактерий», что отражает стандартность розлива препарата («внутриэкземплярная однородность серии»). Образцы для ОСО 42-28-420-П (табл. 1) хранили в морозильной камере при температуре минус $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение всего срока исследования, куда их помещали сразу после получения от изготовителя.

После аттестации образцы каждой серии ОСО применяли в течение года их действия в качестве препарата сравнения при сертификационном контроле промышленных серий туберкулезных вакцин.

2. Среда Левенштейна-Йенсена — селективная плотная питательная среда была приготовлена согласно документу WHO In vitro assays of BCG products⁵.

Методы

Оценку образцов ОСО по показателям «Общее содержание бактерий» (СБ) и «Дисперсность» (Д) проводили фотометрическим методом на фотоэлектроколориметре⁶ КФК-3 при параллельном испытании с действующим ОСО.

Для характеристики показателя «Специфическая активность» ОСО использовали методику, разработанную и валидированную Техническим комитетом по стандартизации ВОЗ⁷, которая широко применяется в международной практике производства и контроля вакцины БЦЖ.

Содержимое 5 ампул (лиофилизат) от каждой серии ресуспендировали в 0,9% растворе натрия хлорида до содержания 0,5 мг в 1 мл — основная взвесь, которую последовательно разводили согласно схеме (табл. 2), используя валидированные дозаторы механические одноканальные (Sartorius Biohit, Финляндия) соответствующего объема.

Разведения ОСО 1:40000 (3) и 1:80000 (4) высевали по 0,1 мл суспензии на 4 пробирки каждое, а разведение 1:160 000 (5) — на 8 пробирок со скошенной средой Левенштейна-Йенсена. Пробирки помещали в термостат при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Через 28 сут (БЦЖ — медленно растущие микобактерии) подсчитывали количество выросших колоний, т. е. количество колониеобразующих единиц (КОЕ), и определяли число жизнеспособных микобактерий БЦЖ в 1 мг препарата. Эту методику принято называть «тест КОЕ». Исследование проводили при параллельном испытании с действующим ОСО.

При расчете количества жизнеспособных клеток БЦЖ использовали в зависимости от числа выросших колоний одну из 4 формул:

- если число колоний соответствует $2\omega \geq \bar{X}_1 + \bar{X}_2 + 2\bar{X}_3$, то расчет проводят по формуле $\frac{d_1}{V} \frac{1}{2} (\bar{X}_1 + \bar{X}_2 + 2\bar{X}_3)$, (1)

⁵ WHO In vitro assays of BCG products. WHO/TB Technical Guide/77.9/unpublished working document in 1977.

⁶ Там же.

⁷ Там же.

- если число колоний соответствует

$$\bar{X}_1 + \bar{X}_2 + 2\bar{X}_3 \geq 2\omega \geq \bar{X}_2 + 2\bar{X}_3,$$

то расчет проводят по формуле $\frac{d_2}{V} \frac{\omega \bar{X}_1}{2\omega + \bar{X}_1 - (\bar{X}_2 + 2\bar{X}_3)}$, (2)

- если число колоний соответствует $\bar{X}_2 + 2\bar{X}_3 \geq 2\omega \geq 2\bar{X}_3$,

то расчет проводят по формуле $\frac{d_3}{V} \frac{\omega \bar{X}_2}{2\omega + \bar{X}_2 - 2\bar{X}_3}$, (3)

- если число колоний соответствует $2\bar{X}_3 \geq 2\omega$,

то расчет проводят по формуле $\frac{d_3}{V} \bar{X}_3$, (4)

где \bar{X}_1 — среднее число колоний, выросших при посеве разведения 3, \bar{X}_2 — при посеве разведения 4, \bar{X}_3 — при посеве разведения 5 (табл. 2), d — величина разведения, V — объем засеянной на пробирку взвеси, ω — постоянное число, равное 40.

Статистическая обработка данных. Результаты обрабатывали с помощью программы Microsoft Office Excel. Определяли среднее значение (X) и стандартное отклонение (SD). При оценке различий между средними величинами применяли t -критерий Стьюдента. Различия показателей считались статистически достоверными при 95% уровне значимости [3].

Результаты

В таблице 3 представлены результаты оценки 5 серий ОСО 42-28-420-П по показателям «Общее содержание бактерий» (СБ) и «Дисперсность» (Д), полученные при их аттестации, мониторинге показателей в течение года действия ОСО и по окончании хранения этих серий (ноябрь 2019 г.).

Анализ данных аттестации серий ОСО (табл. 3) выявил, что показатель «Дисперсность» серий находится в пределах 1,65–2,0, что соответствует требованиям нормативной документации.

Мониторинг показателя «Дисперсность» за год действия ОСО позволил установить статистически незначимые колебания значений этого показателя между образцами в каждой серии. Также не было отмечено влияния низкой температуры хранения и продолжительности ее действия на данный показатель.

Оценка результатов мониторинга показателя «Общее содержание бактерий», который определяется, как и предыдущий, по оптической плотности фотометрическим методом, также подтверждает стандартность образцов внутри каждой серии. Содержание бактериальной массы БЦЖ (*M. bovis* BCG-1) в ампулах при аттестации и мониторинге серии было практически одинаковым (различия между показателями статистически недостоверны). Полученные данные также свидетельствуют об адекватности мероприятий, проводимых на стадии отбора серии — кандидата ОСО туберкулезной вакцины из промышленных серий. При оценке показателя «Общее содержание бактерий» в процессе длительного (до 6 лет) хранения образцов в заявленных условиях испытания — температура минус (20 ± 1) °С — также не выявлено статистически значимых различий между показателями СБ в начале и по завершении исследования или значительных его изменений.

Таким образом, не выявлено каких-либо признаков влияния низких температур и продолжительности их действия на общее содержание бактерий и на дисперсность ОСО. Так, например, для серии 19 значения показателей СБ составляли 0,16 при аттестации, 0,153 — при мониторинге в течение первого года и 0,15 — через 1 год хранения (завершение испытания), а показатель Д в эти же периоды составлял от 1,87 до 1,8–1,87 соответственно. Для серии 15 показатель СБ при аттестации был равен 0,178, а при мониторинге в течение первого года

и через 4 года последующего хранения — 0,17. Средний показатель дисперсности в эти же периоды также колебался незначительно (от 1,8 до 1,83–1,85 соответственно).

Результаты изучения «Специфической активности» — основного показателя качества ОСО 42-28-420-П, полученные при аттестации серий, за год их действия, а также к моменту завершения исследования, представлены в таблице 4.

Анализ этих результатов позволил сделать заключение, что специфическая активность испытуемых серий не снижалась ниже допустимых нормативной документацией лимитов (от 10 до 20 млн/мг) в процессе длительного хранения препарата. Однако количество жизнеспособных клеток в 1 мг серии 14 ОСО через 6 лет хранения достоверно снизилось относительно этого показателя, полученного при ее аттестации и мониторинге.

При аттестации и мониторинге серии ОСО 42-28-420-15, показатель теста КОЕ был практически однозначным: $17,80 \pm 1,56$ и $17,4 \pm 1,9$ млн/мг соответственно. Через 5 лет хранения этой серии в условиях низких температур результат теста КОЕ снизился до значения $14,23 \pm 0,875$, однако статистическую значимость различий между показателями специфической активности доказать не удалось. Анализ этих результатов позволил сделать заключение, что специфическая активность изучаемых серий оставалась в допустимых пределах в процессе длительного (до 5 лет) хранения препарата при температуре минус (20 ± 1) °С. Тем не менее при решении вопроса о сроке годности ОСО 42-28-420-П при хранении серий в рекомендованных условиях данные об изменении показателя «Специфическая активность» ОСО 42-28-420-15 были приняты во внимание.

Таким образом, полученные данные изучения стабильности основных показателей качества ОСО туберкулезной вакцины при хранении образцов при температуре минус (20 ± 1) °С являются основанием для увеличения срока годности ОСО 42-28-420 с 1 до 5 лет. При этом в течение 5-го года хранения ОСО отмечено начало снижения специфической активности препарата, что согласуется с рекомендацией ВОЗ о возможности продления срока годности вторичных стандартов до 4 лет в условиях хранения образцов при температуре минус 20 °С.

Обсуждение

Стабильность стандартного образца, т. е. его свойство сохранять аттестуемые показатели в заданных границах, имеет большое значение в практике производства и контроля ИЛП, так как использование одной и той же серии СО в течение длительного времени позволяет минимизировать ошибки при контроле готовой продукции.

Стабильность свойств вакцины БЦЖ, следовательно, срок годности препарата, зависит от особенности технологии производства (субштамм БЦЖ, состав среды культивирования), валидации всех процессов производства и контроля препарата. Соблюдение условий GMP позволяет производить препарат, соответствующий национальным и международным требованиям, срок годности которого составляет от 1 до 2 лет в условиях хранения при температуре от 2 до 8 °С. Эти же требования распространяются на ОСО 42-28-420-П. Увеличение срока стабильности основных свойств ОСО посредством оптимизации температурного режима хранения препарата представляется актуальным.

В 2009 году в NIBSC образцы трех серий-кандидатов МСО BCG были помещены на хранение при температуре минус 20 °С для изучения стабильности в реальном времени в течение десяти лет. Критерием изменения специфической активности было снижение количества жизнеспособных микобактерий

Стабильность отраслевого стандартного образца вакцины туберкулезной (БЦЖ) Stability of the Industrial Reference Standard of Tuberculosis Vaccine (BCG)

Таблица 3. Результаты оценки влияния условий хранения ОСО на показатели качества «Общее содержание бактерий» и «Дисперсность»

Table 3. Effect of the IRS storage conditions on “Total bacterial count” and “Dispersibility”

№ п/п	Номер серии ОСО 42-28-420-П OSO 42-28-420-P batch number	Средние значения показателя оптической плотности, ОЕ Mean absorbance, AU					
		Общее содержание бактерий, $X \pm SD/n^*$ Total bacterial count, $X \pm SD/n^*$			Дисперсность, $X \pm SD/n^*$ Dispersibility, $X \pm SD/n^*$		
		Аттестация ОСО IRS certification	Мониторинг (в течение года действия) Monitoring (during the year of use)	Завершение хранения (ноябрь 2019) End of the storage period (November 2019)	Аттестация ОСО IRS certification	Мониторинг (в течение года действия) Monitoring (during the year of use)	Завершение хранения (ноябрь 2019) End of the storage period (November 2019)
1	14	0,171 ± 0,01 / 10	0,173 ± 0,015 / 3	0,169 ± 0,01 / 3	1,82 ± 0,12 / 10	1,86 ± 0,134 / 3	1,9 ± 0,1 / 3
2	15	0,178 ± 0,01 / 10	0,17 ± 0,007 / 12	0,17 ± 0,015 / 3	1,8 ± 0,015 / 10	1,85 ± 0,08 / 12	1,83 ± 0,06 / 3
3	16	0,18 ± 0,015 / 10	0,17 ± 0,02 / 24	0,17 ± 0,013 / 3	1,7 ± 0,015 / 10	1,78 ± 0,16 / 24	1,86 ± 0,1 / 3
4	17	0,17 ± 0,015 / 10	0,17 ± 0,02 / 22	0,17 ± 0,015 / 3	1,9 ± 0,08 / 10	1,88 ± 0,15 / 22	1,97 ± 0,06 / 3
5	18	0,17 ± 0,01 / 10	0,162 ± 0,03 / 29	0,15 ± 0,01 / 3	1,9 ± 0,09 / 10	1,93 ± 0,14 / 29	1,85 ± 0,07 / 3
6	19	0,16 ± 0,03 / 10	0,153 ± 0,03 / 19	0,15 ± 0,002 / 3	1,87 ± 0,05 / 10	1,84 ± 0,15 / 19	1,87 ± 0,06 / 3

Примечание. ОЕ — оптическая единица.

* В числителе представлено среднее значение показателя и его стандартное отклонение, в знаменателе — число наблюдений.

Note. AU—absorbance unit.

*The numerator is the mean value and standard deviation, the denominator is the number of observations.

Таблица 4. Результаты оценки влияния хранения ОСО при температуре минус (20 ± 1) °С на показатель качества «Специфическая активность»

Table 4. Effect of the IRS storage at $-(20 \pm 1)$ °C on “Specific activity”

№ п/п	Номер серии ОСО 42-28-420-П OSO 42-28-420-P batch number	Число жизнеспособных клеток БЦЖ, млн/мг Number of viable BCG cells, mln/mg		
		Аттестация (исходные данные) $X \pm SD/n^*$ Certification (baseline data) $X \pm SD/n^*$	Мониторинг в течение года действия серии $X \pm SD/n^*$ Monitoring during the year of use $X \pm SD/n^*$	Завершение хранения (ноябрь 2019) $X \pm SD/n^*$ End of the storage period (November 2019) $X \pm SD/n^*$
1	14	19,12 ± 2,4 / 12	18,99 ± 2,14 / 32	12,85 ± 0,845 / 3
2	15	17,80 ± 1,56 / 6	17,4 ± 1,9 / 25	14,23 ± 0,875 / 3
3	16	15,9 ± 2,09 / 8	17,47 ± 1,5 / 26	16,18 ± 1,225 / 3
4	17	19,45 ± 2,05 / 8	19,55 ± 1,95 / 22	18,26 ± 3,2 / 3
5	18	15,93 ± 1,82 / 7	15,7 ± 2,5 / 20	16,83 ± 1,0 / 3
6	19	15,9 ± 1,73 / 8	16,27 ± 2,26 / 19	17,33 ± 1,8 / 3

* В числителе представлено среднее значение показателя, в знаменателе — число наблюдений.

*The numerator is the mean value, the denominator is the number of observations.

БЦЖ (тест КОЕ). В первый год было проведено три испытания (с интервалом 4–5 месяцев) для формирования базовой линии. Эти данные использованы для оценки специфической активности препарата по проценту выживаемости клеток БЦЖ (КОЕ). Результаты испытания первых нескольких лет продемонстрировали отсутствие изменений показателя «Специфическая активность» всех референс-реагентов БЦЖ [2]. До настоящего времени результаты 10-летнего исследования NIBSC, к сожалению, не опубликованы.

Проведенное исследование по установлению срока годности ОСО 42-28-420-П в условиях хранения образцов (при температуре минус (20 ± 1) °С на большом объеме материала в течение длительного времени (6 лет) позволило оценить долговременную стабильность аттестуемых параметров основных показателей качества («Специфическая активность», «Общее содержание бактерий», «Дисперсность») стандартных образцов 2014–2019 гг., хранившихся при низкой температуре.

Проведенное исследование будет продолжено с целью изучения стабильности серий ОСО 42-28-420-П, предварительно хранившихся в течение 4–5 лет при температуре минус (20 ± 1) °С, при последующем хранении при температуре от 2 до 8 °С. Несомненный интерес представляет также изучение корреляции показателя «Термостабильность», который устанавливают при контроле вакцины БЦЖ на производстве, и стабильности основных показателей препарата в зависимости от сроков и условий хранения препарата.

К настоящему времени утвержден «Межгосударственный стандарт (ГОСТ) ISO Guide 35-2015»⁸, в котором представлены новые подходы к формированию матрицы планирования исследования стандартных образцов, имеющих биологическую природу, введены термины «неопределенность» и «измерение неопределенности». Дальнейшие исследования стабильности СО с учетом данного документа позволят ответить на ряд не решенных до настоящего времени вопросов оценки стабильности СО [4].

⁸ ГОСТ ISO Guide 35-2015. Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации). Дата актуализации 01.06.2019.

Заключение

Концепция использования стандартного образца при контроле туберкулезных вакцин является основополагающей для обеспечения качества этих препаратов. ОСО 42-28-420-П — это вторичный (национальный, или государственный) стандартный образец. При этом аттестованная характеристика «Специфическая активность» ОСО 42-28-420-П прослеживается к МСО ВОЗ («The 1st WHO Reference Reagent for BCG vaccine of Russian BCG-I sub-strain»). Стабильность препарата зависит от особенности технологии производства.

Валидация всех процессов производства и контроля позволяет производить препарат, соответствующий национальным и международным требованиям, срок годности которого и, следовательно, ОСО — 1–2 года в условиях хранения при температуре от 2 до 8 °С.

Согласно результатам проведенной работы показатели качества испытываемых образцов препарата до 5 лет хранения оставались в пределах значений, установленных в процессе аттестации, что позволяет рекомендовать увеличить срок годности ОСО 42-28-420-П до 4 лет с соблюдением рекомендуемых условий хранения.

Таким образом, в результате проведенных исследований стабильности ОСО 42-28-420 вакцины БЦЖ при хранении в условиях низкотемпературного режима минус (20 ± 1) °С было установлено:

1. Основные показатели качества препарата «Общее содержание бактерий», «Дисперсность» и «Специфическая активность» остаются в пределах аттестованных значений до 5 лет.

2. Срок годности серий ОСО может быть продлен до 4 лет включительно при условии хранения образцов при температуре минус (20 ± 1) °С.

3. Увеличение срока годности ОСО позволит использовать один и тот же эталон сравнения более длительное время, что минимизирует ошибки при оценке показателей качества производственных серий вакцины БЦЖ/БЦЖ-М и сэкономит значительные материальные ресурсы, которые требуются при отборе кандидата и аттестации очередной серии ОСО 42-28-420.

Вклад авторов. Н. В. Александрова — контроль проведения экспериментальных исследований, анализ и обобщение полученных результатов, написание текста статьи; А. А. Савина — оценка образцов ОСО по показателям «Общее содержание бактерий», «Дисперсность», «Специфическая активность», статистическая обработка данных; А. В. Наконечная — оценка образцов ОСО по показателям «Общее содержание бактерий», «Дисперсность», «Специфическая активность»; Д. Т. Леви — планирование исследова-

ния и руководство проведением исследования, анализ и обобщение полученных результатов, написание и редактирование текста статьи.

Authors' contributions. Natalia V. Aleksandrova—control of the experimental research, analysis and summarising of the obtained results, writing of the paper; Anna A. Savina—assessment of "Total bacterial count", "Dispersibility", and "Specific activity" of IRS samples, statistical processing of the results; Alla V. Nakonechnaya—assessment of "Total bacterial count", "Dispersibility", and "Specific activity" of IRS samples; Diana T. Levi—planning and supervision of the study, analysis and summarising of the obtained results, writing and editing of the paper.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590046-9).

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

Conflict of interest. Diana T. Levi is a member of the Editorial Board of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

1. Ho MM, Markey K, Rigsby P, Hockley J, Corbel MJ. Report of an International collaborative study to establish the first WHO Reference Reagents for BCG vaccines of three different sub-strains. *Vaccine*. 2011;29(3):512–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.10.066>
2. Dagg B, Hockley J, Rigsby P, Ho MM. The establishment of sub-strain specific WHO Reference Reagents for BCG vaccine. *Vaccine*. 2014;32(48):6390–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.09.065>
3. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Изд-во «Практика»; 1999. [Glantz S. *Biomedical statistics*. Moscow: Publishing house "Practice"; 1999 (In Russ.)]
4. Фадейкина ОВ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(8):44–50. [Fadeikina OV, Volkova RA. Elaboration of certification procedures for reference standards of biological drugs. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2017;51(8):716–21 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Александрова Наталья Владимировна, канд. мед. наук. Natalia V. Aleksandrova, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1069-8065>

Савина Анна Александровна. Anna A. Savina. SPIN-код РИНЦ: 2103-3590, AuthorID: 936217

Наконечная Алла Витальевна. Alla V. Nakonechnaya. SPIN-код РИНЦ: 7064-9350, AuthorID: 936279

Леви Диана Тимофеевна, д-р мед. наук, проф. Diana T. Levi, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0783-9282>

Поступила 15.07.2020

После доработки 30.07.2020

Принята к публикации 28.08.2020

Received 15 July 2020

Revised 30 July 2020

Accepted 28 August 2020