

БИОПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Рецензируемый научно-практический журнал
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Том 17, № **2**
Апрель – июнь 2017



ISSN 2221-996X



9 772221 996004

10 лет кожной пробе с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (Диаскинтест®) и 110 лет туберкулиновой пробе Манту —
сравнение эффективности

Изучение биологической и генетической стабильности штамма № 205
вируса клещевого энцефалита, применяемого для производства вакцин
клещевого энцефалита Энцевир, Энцевир Нео детский

Редакция журнала не несет ответственности за содержание рекламных материалов.

Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции журнала.

К публикации принимаются только статьи, подготовленные в соответствии с «Правилами направления, рецензирования и опубликования научных статей в журнале «Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение», размещенными на сайте журнала <http://biopreparaty.regmed.ru>

Все статьи проходят рецензирование двумя рецензентами. Используется модель двойного слепого рецензирования.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается. Ускоренная публикация не допускается.

Труды заочных конференций не публикуются.



Л. А. Тарасевич

Учредитель

Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы
средств медицинского
применения»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Издатель

Издательский дом «Фолиум»

Главный редактор

Олефир Ю. В.

Заместители**главного редактора**

Меркулов В. А.

Бондарев В. П.

Ответственный секретарь

Климов В. И.

Научный редактор

Лебединская Е. В.

Редактор

Шестакова А. П.

Члены редколлегии

Авдеева Ж. И.

Балаболкин И. И.

Борисевич И. В.

Воробьева М. С.

Гущин И. С.

Дармов И. В.

Иванов В. Б.

Игнатьев Г. М.

Леви Д. Т.

Медуницын Н. В.

Мовсисянц А. А.

Мосягин В. Д.

Хамитов Р. А.

Редакционный совет

Амвросьева Т. В. (Беларусь)

Борисевич С. В. (Сергиев Посад)

Брико Н. И. (Москва)

Волчков В. Е. (Франция)

Гинцбург А. Л. (Москва)

Дятлов И. А. (Оболensk)

Зверев В. В. (Москва)

Кутырев В. В. (Саратов)

Львов Д. К. (Москва)

Михайлов М. И. (Москва)

Покровский В. И. (Москва)

Савченко В. Г. (Москва)

Учайкин В. Ф. (Москва)

Хаитов Р. М. (Москва)

Чумаков К. М. (США)

СОДЕРЖАНИЕ**Обзоры**

- 10 лет кожной пробе с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (Диаскинтест®) и 110 лет туберкулиновой пробе Манту – сравнение эффективности
Л. В. Слогодкая, Е. М. Богородская, Д. Т. Леви, П. П. Сельцовский 67
- Гемофильная инфекция типа *b*. Заболеваемость и вакцинопрофилактика
М. В. Абрамцева, А. П. Тарасов, Т. И. Немировская, В. П. Ковтун, В. А. Волков, А. А. Мовсисянц 78
- Анализ потребностей в стандартных образцах, предназначенных для оценки качества биологических лекарственных средств
В. И. Климов, Е. И. Саканян, Р. А. Волкова, О. В. Фадейкина, А. А. Мовсисянц, Е. В. Лебединская, А. П. Шестакова 87

Оригинальные статьи

- Изучение биологической и генетической стабильности штамма № 205 вируса клещевого энцефалита, применяемого для производства вакцин клещевого энцефалита Энцевир, Энцевир Нео детский
М. С. Воробьева, Г. М. Игнатьев, Н. А. Нетесова, Е. В. Отрашевская, Н. Х. Ставицкая, М. С. Щербинина, К. А. Саркисян, В. А. Шевцов, А. В. Рукавишников, В. П. Бондарев 95
- Разработка подходов к проведению испытания гетерологических сыровоточных препаратов по показателю «Стерильность» методом мембранной фильтрации
С. М. Суханова, Э. Е. Бердникова 103
- Изучение возможности увеличения срока годности стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомplementарной активности
О. Г. Корнилова, М. А. Кривых, Е. А. Хуснатдинова, Е. С. Коновалова, Р. А. Волкова, О. В. Фадейкина, Э. Ю. Кудашева, А. А. Мовсисянц 110
- Особенности аттестации и перспективы применения стандартного образца тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза
О. Г. Корнилова, И. Л. Арефьева, Е. С. Коновалова, Р. А. Волкова, О. В. Фадейкина, Э. Ю. Кудашева, А. А. Мовсисянц 116
- Аттестация отраслевого стандартного образца специфической активности вакцины полиомиелитной пероральной, двухвалентной, живой аттенуированной 1, 3 типов – БиВак полио
Е. В. Карпова, А. Д. Сангаджиева, Т. В. Мамонтова, О. В. Фадейкина, Р. А. Волкова, К. А. Саркисян, А. А. Мовсисянц 122

Хроника

- V Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы профилактики, диагностики и лечения туберкулеза у детей и подростков» совместно с заседанием профильной комиссии Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности «Фтизиатрия» при главном внештатном детском специалисте фтизиатре 128
- Владимир Иванович Климов (к 65-летию со дня рождения) 129
- Дмитрий Владимирович Шведов (к 50-летию со дня рождения) 130

Адрес редакции:

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 127051, Российская Федерация, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.
Тел.: +7 495 234-61-04, +7 495 214-91-19 (доб. 63-35; 63-36). E-mail: biopreparaty@expmed.ru.

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС77-53128 от 14 марта 2013 г.

Все права защищены. Любое воспроизведение опубликованных материалов без письменного согласия редакции не допускается. При перепечатке ссылка на журнал обязательна.

Журнал включен в наукометрическую базу данных Science Index.

Подписано в печать 31.05.2017.

Подписной индекс **25120**

в каталоге «Газеты. Журналы» агентства «Роспечать».

Выходит один раз в три месяца.

Дизайн, верстка, печать: Издательский дом «Фолиум»





L. A. Tarasevich

PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Peer-reviewed scientific and practical journal

Founder

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

Publisher

Folium Publishing Company

Editor-in-Chief

Olefir Yu. V.

Deputy Editor-in-Chief

Merkulov V. A.

Bondarev V. P.

Executive Secretary

Klimov V. I.

Science Editor

Lebedinskaya E. V.

Editor

Shestakova A. P.

Editorial Board

Avdeeva Zh. I.

Balabolkin I. I.

Borisevich I. V.

Darmov I. V.

Gouschin I. S.

Ivanov V. B.

Ignatiev G. M.

Khamitov R. A.

Levi D. T.

Medunitsyn N. V.

Movsesyants A. A.

Mosyagin V. D.

Vorobieva M. S.

Editorial Council

Amvrosieva T. V. (Belarus)

Borisevich S. V. (Sergiev Posad)

Briko N. I. (Moscow)

Volchkov V. E. (France)

Gintsburg A. L. (Moscow)

Dyatlov I. A. (Obolensk)

Zverev V. V. (Moscow)

Kutyrev V. V. (Saratov)

Lvov D. K. (Moscow)

Mikhailov M. I. (Moscow)

Pokrovskiy V. I. (Moscow)

Savchenko V. G. (Moscow)

Uchaikin V. F. (Moscow)

Khaitov R. M. (Moscow)

Chumakov K. M. (USA)

CONTENTS

Reviews

Comparison of efficacy of Diaskintest®, a skin test with a recombinant tuberculosis allergen, used for 10 years and Mantoux tuberculin sensitivity test used for 110 years

L. V. Slogotskaya, E. M. Bogorodskaya, D. T. Levi, P. P. Seltsovsky 67

Haemophilus influenzae type b. Incidence rate and preventive vaccination

M. V. Abramtseva, A. P. Tarasov, T. I. Nemirovskaya, V. P. Kovtun, V. A. Volkov, A. A. Movsesyants 78

Analysis of the demand for reference standards used in quality evaluation of biologicals

V. I. Klimov, E. I. Sakanyan, R. A. Volkova, O. V. Fadeykina, A. A. Movsesyants, E. V. Lebedinskaya, A. P. Shestakova 87

Original Articles

Analysis of biological and genetic stability of tick-borne encephalitis strain 205 used in the production of tick-borne encephalitis vaccines EnceVir and EnceVir Neo for children

M. S. Vorobyeva, G. M. Ignatyev, N. A. Netesova, E. V. Otrasevskaya, N. Kh. Stavitskaya, M. S. Shcherbinina, K. A. Sarkisyan, V. A. Shevtsov, A. V. Rukavishnikov, V. P. Bondarev 95

Development of new approaches to sterility testing of heterologous serum products by membrane filtration method

S. M. Sukhanova, Z. E. Berdnikova 103

Contemplation of the possibility of extending the shelf life of human immunoglobulin reference standard used for determination of anticomplementary activity

O. G. Kornilova, M. A. Krivkykh, E. A. Husnatdinova, E. S. Konovalova, R. A. Volkova, O. V. Fadeykina, E. Yu. Kudasheva, A. A. Movsesyants 110

Certification and potential future use of the reference standard designed for the test system for determination of the fractional (antigenic) composition of human serum products by immunoelectrophoresis

O. G. Kornilova, I. L. Arefyeva, E. S. Konovalova, R. A. Volkova, O. V. Fadeykina, E. Yu. Kudasheva, A. A. Movsesyants 116

Certification of the industry reference standard for the specific activity of «BiVac polio» – live attenuated bivalent oral polio vaccine type 1 and 3

E. V. Karpova, A. D. Sangadzhieva, T. V. Mamontova, O. V. Fadeykina, R. A. Volkova, K. A. Sarkisyan, A. A. Movsesyants 122

Chronicle

5th All-Russian scientific-practical conference with international participation «Actual issues of prevention, diagnosis and treatment of tuberculosis in children and adolescents» in conjunction with the meeting of the profile commission of the Ministry of Health of the Russian Federation in the specialty «Phthysiology» with the chief freelance child specialist phthisiatrician 128

Vladimir Ivanovich Klimov (on the 65th anniversary) 129

Dmitrii Vladimirovich Shvedov (on the 50th anniversary) 130

Address of the Editorial Office:

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. Tel.: +7 495 234-61-04, +7 495 214-91-19 (ext. 63-35; 63-36). E-mail: biopreparaty@expmed.ru.

Publication is registered by the Federal Service for Supervision in the Sphere of Telecom, Information Technologies and Mass Communications. Certification of the Mass Media Registration PI No. ФС77-53128 of March 14, 2013.

All rights reserved. No part of this publication may be used or reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the Publishers. Reproducing any part of this material a reference to the journal is obligatory.

The publication data for the journal is May 31, 2017.

Publication is once every 3 months.

CRC preparation and printing: Folium Publishing Company.



10 лет кожной пробе с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (Диаскинтест®) и 110 лет туберкулиновой пробе Манту — сравнение эффективности

Л. В. Слогодская^{1,2}, Е. М. Богородская^{1,2}, Д. Т. Леви³, П. П. Сельцовский^{1,2}

¹ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения

«Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», 107014, Российская Федерация, Москва, ул. Стромынка, д. 10

² Кафедра фтизиатрии Государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования Российской Федерации, 107014, Российская Федерация, Москва, ул. Стромынка, д. 10

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Российская Федерация, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

Поступила 30.03.2017 г. Принята к публикации 14.04.2017 г.

Проведено сравнение представленных как в отечественной, так и зарубежной литературе результатов диагностики туберкулеза различными методами *in vivo* (кожные тесты — проба Манту, проба с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (Диаскинтест®)) и *in vitro* (тесты IGRA). Положительная реакция на пробу Манту, применяемую уже более 100 лет, в условиях массовой вакцинации против туберкулеза может служить как маркером состоявшейся вакцинации, так и маркером произошедшего инфицирования вирулентными микобактериями туберкулеза. На фоне массовой вакцинации БЦЖ положительная реакция на туберкулин в значительной мере теряет прогностическую значимость для оценки риска развития туберкулеза. В России разработан, зарегистрирован в 2008 г. и с 2009 г. внедрен в практику здравоохранения препарат для внутрикожного теста Аллерген туберкулезный рекомбинантный (Диаскинтест®). Этот препарат представляет собой гибридный рекомбинантный белок ESAT6–CFP10, продуцируемый *Escherichia coli* BL21(DE3)/pCFP-ESAT. Проведение дифференциальной диагностики поствакцинальной (БЦЖ) и инфекционной аллергии, а также скрининга туберкулезной инфекции с помощью пробы с Диаскинтестом® продемонстрировало высокую эффективность препарата — выявляемость туберкулеза у лиц с положительной реакцией на нее в десятки раз выше, чем при положительной пробе Манту. И проба с Диаскинтестом®, и тесты IGRA, как правило, не дают ложноположительных реакций. В результате не требуется дополнительное обследование неинфицированных лиц, а превентивная терапия проводится только лицам с установленным высоким риском развития туберкулеза.

Ключевые слова: вакцина БЦЖ; проба Манту; Диаскинтест®; тест IGRA; рекомбинантный белок ESAT6–CFP10; дифференциальная диагностика поствакцинальной и инфекционной аллергии; скрининг туберкулезной инфекции.

Библиографическое описание: Слогодская ЛВ, Богородская ЕМ, Леви ДТ, Сельцовский ПП. 10 лет кожной пробе с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (Диаскинтест®) и 110 лет туберкулиновой пробе Манту — сравнение эффективности. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(2): 67–77.

Более 110 лет используется туберкулиновая проба Манту как способ выявления туберкулезной инфекции. Однако после внедрения вакцинации БЦЖ специфичность этой пробы значительно снизилась из-за большого числа «ложноположительных» реакций [1–6]. В нашей стране массовая вакцинация против туберкулеза с охватом прививками более 95 % новорожденных проводится многие десятилетия [7]. Сенсибилизация нетуберкулезными микобактериями также снижает специфичность пробы Манту [5, 8].

Примером низкой специфичности пробы Манту в условиях массовой вакцинации БЦЖ может служить проведенное в Москве с 2000 по 2006 г. исследование — не более 1 % из числа туберкулиноположительных детей и подростков были взяты на диспансерное наблюдение в группы риска по результатам пробы Манту. Авторы подсчитали, что специфичность пробы составила 41,7 % у детей и 22,2 % — у подростков [2, 3]. Такая же ситуация наблюдалась и в последующие годы [9, 10]. В Саратовской области группа риска составила 1,5 % от обследованных [11]. Специфичность пробы Манту, по данным авторов из С.-Петербурга, составила всего 8,3 и 23 % [12, 13].

В мире используется в основном 3 вида туберкулина: датский PPDRT23 (в большинстве стран), американский PPD-S и российский PPD-L (ППД-Л). Американский и датский туберкулины изготовлены из одного штамма микобактерий туберкулеза человеческого вида, но разными методами, поэтому их специфическая активность различна: 2 ТЕ (ТЕ — туберкулиновая единица) PPDRT23 эквивалентны 5 ТЕ PPD-S [14]. Российский туберкулин PPD-L изготовлен из микобактерий 2 видов — человеческого и бычьего, 2 ТЕ российского эквивалентны 2 ТЕ датского туберкулина. Производители туберкулинов определяют различные уровни диагностической значимости препаратов туберкулина в зависимости от группы риска и наличия вакцинации. Так, в инструкции к датскому туберкулину папула 15 мм — граница положительного результата у вакцинированных БЦЖ детей, а у детей, не вакцинированных БЦЖ, в возрасте до 5 лет — диагностическое значение имеет реакция более 10 мм. На пробу Манту с 5 ТЕ PPD-S положительным результатом считается реакция более 10 мм.

Показатель специфичности туберкулиновой пробы зависит от того, какая граница положительного результата выбрана. По данным немецких исследователей, при па-

пуле >5 мм специфичность пробы Манту с 2 ТЕ PPDRT23 составляет 64,5 % [15], но даже при таком низком пороге ряд инфицированных лиц остается невыявленным.

Показатель чувствительности туберкулиновой пробы также зависит от выбранной границы положительного результата. В России высокая чувствительность пробы Манту объясняется тем, что нижней границей положительного результата установлена папула размером 5 мм. При такой высокой чувствительности специфичность пробы резко снижена.

По результатам мета-анализа 14 зарубежных исследований, совокупная чувствительность туберкулиновой пробы составила 71 % [16]. По данным Л. В. Поддубной и соавт. [17], у детей с осложненным течением туберкулеза чувствительность пробы Манту составила 77 %.

Недостаточная чувствительность к туберкулину при туберкулезе может быть обусловлена так называемой «отрицательной энергией». Она связана с «недостаточным» ответом Т-клеток, включая снижение антигенспецифической пролиферации и способности к продукции интерлейкина-2 (ИЛ-2) и ИФН- γ . Т-клетки таких больных активно продуцируют ИЛ-10, который опосредует прямое энергизирующее действие [5, 18, 19].

Ряд авторов считает ошибочной практику ревакцинации БЦЖ туберкулин-отрицательным вакцинированным лицам, поскольку отрицательная реакция на пробу Манту не означает отсутствие иммунологической памяти [20, 21].

Связь между положительными реакциями на туберкулин и риском развития активного туберкулеза принято исследовать только среди невакцинированных лиц, так как вакцинация БЦЖ оказывает влияние на результаты туберкулинодиагностики [5, 22, 23].

По данным R. Diel и соавт. (2009), чувствительность пробы Манту при латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ) при папуле >10 мм составляла 72 %, а при размере папулы >15 мм — только 39,7 % [15].

Учитывая значительные изменения в эпидемиологии микобактериальных инфекций, произошедшие во многих странах за последние десятилетия, для создания практических рекомендаций по интерпретации туберкулиновых проб необходима свежая информация о туберкулиновых реакциях у населения [24].

Открытие антигенов ESAT-6, CFP-10, специфичных для вирулентных микобактерий комплекса *Mycobacterium tuberculosis*, привело к разработке тестов *in vitro*, основанных на измерении продуцирования гамма-интерферона (ИФН- γ) Т-лимфоцитами крови в ответ на стимуляцию этими антигенами. Эти тесты, названные IGRA (Interferon-gamma release assay), показали почти 100 % специфичность, поскольку на результаты этих тестов не влияет вакцинация БЦЖ [16, 25, 26].

Появление новых тестов IGRA переломило ситуацию в определении туберкулезной инфекции. В качестве антигенов в них используются белки, которые секретируются только вирулентными микобактериями и только в процессе деления клеток. Принято считать, что поскольку ESAT-6, CFP-10 экспрессируются при размножении микобактерий, иммунный ответ на эти антигены соответствует наличию активной туберкулезной инфекции [27–29].

Тесты IGRA обладают, помимо высокой специфичности, достаточно высокой чувствительностью [30–32] и прогностической значимостью в оценке вероятности развития заболевания [27, 29, 33–35]. Сравнение прогностического значения туберкулиновой пробы Манту и тестов IGRA показало, что высокие показатели продукции ИФН- γ в тес-

тах IGRA коррелировали с повышенным риском развития туберкулеза [28, 33, 36–39].

По результатам многочисленных исследований, превентивная терапия у лиц с положительным тестом IGRA существенно уменьшает риск развития у них активного процесса [32, 40]. Ранее, до появления тестов IGRA, при решении вопроса о превентивной терапии лиц с ЛТИ использовались результаты туберкулиновой пробы Манту. В результате ее нередко назначали лицам, не инфицированным *M. tuberculosis*, а вакцинированным БЦЖ или инфицированным нетуберкулезными микобактериями. Большой обзор зарубежной литературы с мета-анализом указывает, что положительная реакция на туберкулин обладает низкой прогностической значимостью для оценки риска развития туберкулеза [35].

В соответствии с современными представлениями, основанием для превентивной терапии являются положительные тесты IGRA. Риск развития туберкулеза не увеличивается, если тест IGRA отрицательный, а реакция на пробу Манту — положительная [41]. Установлено, что среди лиц, имеющих семейный контакт с больными туберкулезом, значительно чаще заболевают лица с положительным тестом IGRA [33]. В контингентах из контактов с больными туберкулезом частота развития туберкулеза многократно выше у лиц с положительными, чем с отрицательными результатами IGRA [42].

Мета-анализ публикаций за 2004–2013 гг., проведенный M. Lamberti [34], показал, что большинство национальных руководств рекомендуют тесты IGRA для диагностики туберкулезной инфекции. В то же время высокая стоимость таких тестов не позволяет ВОЗ рекомендовать эти тесты для стран с низкими доходами. Обзор литературы и мета-анализ, проведенный M. Rangaka и соавт. [35], показал, что благодаря применению тестов IGRA, значительно снижается количество лиц, подлежащих превентивной терапии при латентной туберкулезной инфекции. Отбор на превентивную терапию по результатам высокоспецифичных тестов IGRA привел к существенному сокращению по сравнению с пробой Манту числа лиц, которым показано превентивное лечение [40, 43, 44].

Несмотря на несомненные достоинства тестов IGRA, существенным их недостатком, помимо высокой стоимости, является специальное оснащение лаборатории, условия сохранения жизнеспособности лимфоцитов, внутривенные манипуляции. Указанные ограничения делают невозможным использование тестов IGRA для скрининговых массовых исследований, подобно внутрикожной пробе Манту. Решением этой проблемы явилось создание нового препарата для внутрикожной пробы, который состоит из специфичных для вирулентных микобактерий туберкулезного комплекса белков — ESAT6 и CFP10, т.е. тех же белков, которые используются в тестах IGRA.

В отличие от тестов IGRA, которые выявляют *in vitro* только образование ИФН- γ циркулирующими Т-клетками, в реакциях на внутрикожное введение туберкулезных аллергенов задействованы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, а также цитокины: ИФН- γ , фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), ФНО- β и др. [41, 45]. На моделях зараженных туберкулезом животных было показано, что экспрессия и секреция белков ESAT6–CFP10 прямо коррелирует с процессом размножения микобактерий туберкулеза и развитием специфической патологии [46, 47].

В России в лаборатории биотехнологии Института молекулярной медицины (ИММ) при Первом МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Москва) разрабо-

тан препарат для внутрикожного теста Аллерген туберкулезный рекомбинантный (Диаскинтест®). Этот препарат представляет собой гибридный рекомбинантный белок ESAT6–CFP10, продуцируемый *Escherichia coli* BL21(DE3)/pCFP-ESAT [48]. Доклинические исследования этого препарата были проведены в 2004–2005 гг. Д. Т. Леви, М. Л. Рухаминой [49] и в 2006 г. И. В. Бочаровой, А. В. Дёминым [50].

Доклиническое исследование препарата Диаскинтест® включало изучение: острой токсичности на мышах; острой токсичности, местной реакции, сенсибилизирующего действия на здоровых интактных морских свинок; острой и хронической токсичности различных разведений препарата Диаскинтест® на линейных мышах; шоковой реакции на морских свинках, зараженных вирулентным штаммом микобактерий туберкулеза; специфичности на морских свинках, иммунизированных вакциной туберкулезной (БЦЖ); специфичности на сенсибилизированных атипичными микобактериями морских свинок; специфической активности на морских свинках, зараженных вирулентными штаммами микобактерий туберкулеза; специфической активности на морских свинках, сенсибилизированных убитым вирулентным штаммом микобактерий туберкулеза. Была доказана безопасность, высокая специфичность и чувствительность препарата.

В 2006 г. в Московском городском научно-практическом центре борьбы с туберкулезом Комитета здравоохранения г. Москвы были начаты клинические исследования внутрикожной пробы с препаратом Диаскинтест®. В результате проведенных исследований были получены следующие результаты [51]:

1. Внутрикожная проба с Диаскинтестом® безопасна — не наблюдалось необычных общих реакций и неспецифических местных проявлений. Повторные пробы не вызывали сенсибилизации организма.

2. Проба с препаратом Диаскинтест® обладает высокой специфичностью: частота отрицательных реакций у детей после вакцинации БЦЖ составила 100 % (95 % ДИ 98,3–100,0 %); при нетуберкулезных заболеваниях легких у взрослых — 94,6 % (95 % ДИ 90,4–98,8 %), у детей — 100 % (95 % ДИ 95,7–100,0 %); при внегочных процессах нетуберкулезной природы у взрослых — 98,5 % (95 % ДИ 94,2–100 %); у лиц, излеченных от внегочных форм туберкулеза — 100,0 % (95 % ДИ 94,8–100,0 %).

3. Проба с Диаскинтестом® обладает высокой чувствительностью: частота положительных реакций у детей и подростков с нелеченным туберкулезом органов дыхания составила 97,3 % (95 % ДИ 94,9–99,6 %); у взрослых, больных туберкулезом органов дыхания — 84,2 % (95 % ДИ 79,7–88,8 %); у взрослых, больных туберкулезом внегочных локализаций — 89,7 % (95 % ДИ 75,2–100,0 %).

4. Частота положительных реакций на пробу с Диаскинтестом® при латентной туберкулезной инфекции у детей и подростков, наблюдаемых в диспансерных группах риска, коррелировала со степенью риска развития заболевания, достигая максимума у лиц с виражом реакций на пробу Манту из семейного контакта с больными туберкулезом бактериовыделителями — 94,9 % (95 % ДИ 87,9–100 %) (при попарном сравнении со всеми другими группами $p < 0,001$ по критерию χ^2). У детей и подростков, контактировавших в учебном заведении с больными туберкулезом без бактериовыделения, частота положительных реакций была достоверно ниже ($p < 0,001$ по критерию χ^2) — 2,2 % (95 % ДИ 0,94–3,92 %).

5. Динамика реакций на пробу с Диаскинтестом® позволяет прогнозировать развитие туберкулезной инфекции. В группе детей и подростков с первоначально отрицательной реакцией у 2,5 % лиц из неразобщенных контактов с бактериовыделителями произошла конверсия (вираж) реакций на пробу с Диаскинтестом®. Уменьшение интенсивности реакции, вплоть до отрицательной, отмечено у 52,0 % детей и подростков, получивших полный курс контролируемой химиотерапии, и у 44,4 % (95 % ДИ 33–56 %) взрослых, больных туберкулезом органов дыхания после 3 месяцев лечения.

Частота положительных реакций на пробу с Диаскинтестом® зависела от результата лечения: у детей с нелеченым туберкулезом органов дыхания она достоверно выше, чем среди закончивших полный курс химиотерапии — 97,3 % (95 % ДИ 94,9–99,6 %) и 60,0 % (95 % ДИ 42,8–83,8 %) соответственно ($p < 0,0001$). У взрослых, больных туберкулезом органов дыхания, с длительностью лечения менее 30 дней положительные реакции на Диаскинтест® отмечаются достоверно чаще, чем у больных, получавших специфическое лечение более 100 дней: 84,2 % (95 % ДИ 79,7–88,8 %) и 55,9 % (95 % ДИ 44,1–66,7 %) соответственно ($p < 0,001$ по критерию χ^2).

6. У детей из контакта с бактериовыделителями, имеющих вираж реакций на пробу Манту, частота положительных реакций на пробу с Диаскинтестом® достоверно ниже у лиц, получивших контролируемую превентивную химиотерапию, чем у лиц, не получивших таковую: 60,0 и 94,5 % соответственно ($p < 0,0001$).

У больных туберкулезом в сочетании с ВИЧ-инфекцией имеется достоверная разница ($p < 0,01$ по критерию χ^2) в частоте положительных реакций на пробу с Диаскинтестом® при разном количестве $CD4^+$ Т-лимфоцитов в периферической крови: 55,3 % у больных при $CD4^+$ Т-лимфоцитов более 200 клеток в 1 мкл и 22,0 % — при менее 200 клеток. Таким образом, у больных ВИЧ-инфекцией можно использовать кожную пробу с Диаскинтестом®, учитывая при этом, что по мере увеличения иммуносупрессии эффективность ее применения снижается [52].

Доклинические и клинические исследования Диаскинтеста® с использованием двух доз препарата показали, что доза 0,1 мкг обладает значительно более низкой чувствительностью, чем доза 0,2 мкг, что объяснило выбор последней [50, 51]. По результатам клинических исследований препарат Аллерген туберкулезный рекомбинантный (Диаскинтест®) был зарегистрирован в 2008 г. и с 2009 г. внедрен в практику здравоохранения (Приказ Минздрава России от 29.10.2009 г. № 855).

Изучение результатов постановки пробы с Диаскинтестом®, проведенной при массовых обследованиях населения в Москве в 2012–2014 гг., показали высокую чувствительность теста (более 95 %) при сплошном обследовании впервые выявленных больных туберкулезом детей и подростков [10, 53]. Высокие показатели чувствительности пробы получены и в других регионах страны: в Новосибирской области [17], Рязанской области [54, 55], С.-Петербурге [56] и других.

Отрицательные реакции как на пробу с Диаскинтестом®, так и на пробу Манту при туберкулезе встречаются в раннем детском возрасте (из-за несформированного иммунитета); при осложнениях вакцинации БЦЖ (оститах); ВИЧ-инфекции [10, 53]. Тест показал высокую эффективность проведенных скрининговых исследований у детей. Уже в первых исследованиях, выполненных в 2009 г. в Москве, выявляемость туберкулеза у лиц с положительной

реакцией на Диаскинтест® составила 6,6 % (15 из 227) [57]. Широкое внедрение с 2010 г. в ряде регионов страны препарата Диаскинтест® для обследования детей, реагирующих положительно на пробу Манту, позволило выявить дополнительно значительное число больных туберкулезом [58]. В дальнейшем при массовом скрининге в 2013 г. проба с препаратом Диаскинтест® была поставлена 131000 детей с положительными результатами на туберкулиновую пробу Манту. Показано, что выявляемость туберкулеза среди лиц с положительными реакциями на Диаскинтест® составила 5 % из числа обследованных, столько же лиц (5 %) выявлено с посттуберкулезными изменениями (IIIA группа). В то же время выявляемость туберкулеза среди туберкулин-положительных детей была в 40 раз меньше — 0,13 % [10]. В Ставропольском крае у лиц с положительной реакцией на Диаскинтест® активный туберкулез был выявлен у 11–14 % человек [59]. В Рязанской области среди детей с положительными реакциями на Диаскинтест® лица с посттуберкулезными изменениями выявлены в 12,4 % случаев. Все эти дети ранее наблюдались в ПТД в группах риска по результатам пробы Манту, но диагноз был поставлен только после обнаружения положительной реакции на Диаскинтест®, которая служила критерием отбора на компьютерную томографию (КТ). После этого они были взяты на учет в IIIA группу [55]. При скрининге в Пермской области среди лиц с положительной реакцией на Диаскинтест® у 1,2 % выявлен активный туберкулез, 2,8 % взяты на учет в IIIA группу, среди них большинство (72 %) ранее наблюдались в диспансере в связи с изменением чувствительности на пробу Манту, но у них не были обнаружены локальные изменения [60]. В Нижегородской области туберкулез выявлен у 1,4 % от числа положительно реагирующих на Диаскинтест®, посттуберкулезные изменения — у 9,0 %, в то время как по пробе Манту выявление туберкулеза составило всего 0,006 % от обследованных и 0,007 % от имеющих положительную реакцию на пробу Манту [61]. В Ярославской области среди направленных к фтизиатру по результатам пробы Манту только 18,2 % детей и подростков действительно нуждались в обследовании, а из них лишь у каждого седьмого (13–14 %) установлена латентная туберкулезная инфекция. В то же время по результатам пробы с препаратом Диаскинтест® на консультацию к фтизиатру следовало направить лишь 0,8 % дошкольников и 1,57 % подростков [62].

В первые годы внедрения пробы с препаратом Диаскинтест® в Москве показатель заболеваемости туберкулезом детей и подростков увеличился за счет повышения выявляемости заболевания, а в дальнейшем — стал снижаться [9, 10]. В 42 субъектах Российской Федерации, где более чем у 30 % впервые выявленных больных детей при обнаружении туберкулеза была использована проба с Диаскинтестом®, в 2010–2011 гг. произошел рост суммарного числа впервые выявленных больных на 28,2 %, а в остальных территориях — снижение их числа на 7 % ($p < 0,01$) [63].

Для сравнения — за период 2000–2006 гг. методом туберкулинодиагностики в Москве было выявлено только 53,7 % заболевших детей и 14 % подростков, при этом рассчитанная эффективность туберкулинодиагностики составила 0,003 % у детей и 0,002 % у подростков [2, 3]. Проба с препаратом Диаскинтест® является критерием отбора на компьютерную томографию (КТ), в результате которой стали выявляться столь малые формы туберкулеза внутри-

грудных лимфоузлов, которые на обычных рентгенограммах не выявлялись [1, 9, 10, 55, 60].

В Москве внедрение пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным и компьютерной томографии привело к росту доли «малых форм» заболевания (процессов, выявленных только по результатам КТ). Доля «малых форм» среди впервые выявленных больных детей 0–14 лет увеличилась в 2010–2012 гг. с 60 до 90 %. Доля детей, больных туберкулезом, выявленных при профилактических осмотрах, выросла до 82–90 % (в 2008–2009 гг. — 70–75 %) [9].

В Москве с 2010 г., согласно методическим рекомендациям [64], превентивная химиотерапия в группах риска у детей, наблюдаемых в противотуберкулезных диспансерах в связи с изменившейся реакцией на пробу Манту, проводится только лицам с положительной реакцией на Диаскинтест, а не всем, как раньше. Это не привело к увеличению показателя заболеваемости в этих группах, напротив, он снизился. Так, в 2013 г. по сравнению с 2012 г. отмечено снижение заболеваемости со 108,3 до 32,8 на 100000 контингента группы детей с виражом пробы Манту, с 792,9 до 172,2 — из группы лиц с гиперергической реакцией и со 185,7 до 44,0 — из группы лиц с усилением реакции соответственно. Заболеваемость лиц из контактов с больными туберкулезом с бактериовыделением (IV группа) снизилась с 1051,4 до 185,7 соответственно [10].

В Саратовской области также превентивную терапию проводили только детям, наблюдавшимся в этих группах диспансерного учета, имеющим положительную реакцию на Диаскинтест®. Никто из лиц с отрицательной реакцией, не получавших химиотерапию, туберкулезом не заболел [11].

В целом в Российской Федерации в 2012–2013 гг. произошло снижение заболеваемости туберкулезом в VIA группе диспансерного учета (ГДУ) (вираж туберкулиновой пробы) и VIB (усиление реакции Манту на 6 мм) и рост — в VIB (гиперергия реакции Манту). Несмотря на наибольшее снижение показаний к превентивной терапии по пробе с препаратом Диаскинтест® в VIA группе (до 38,5 %) и VIB (до 60,3 %), в этих группах произошло снижение показателя заболеваемости, а в VIB группе, где показания к превентивной терапии были снижены меньше всего (до 67,6 %), произошел рост заболеваемости [63].

Почти все дети, составляющие группу лиц с посттуберкулезными изменениями (IIIA ГДУ), по результатам пробы с Диаскинтестом® (у 98 % контингента положительные реакции) направлялись на компьютерную томографию (КТ), в результате которой были обнаружены мельчайшие посттуберкулезные кальцинаты [9, 10, 55, 60].

В целом в Российской Федерации рост числа детей в IIIA ГДУ в 2010–2011 гг. зафиксирован в 10–15 субъектах Российской Федерации. В группе субъектов Российской Федерации, где более чем у 30 % впервые выявленных детей при диагностике туберкулеза был использован Диаскинтест®, в 2010–2011 гг. произошел рост на 58,1 % суммарного числа лиц, взятых на учет в IIIA ГДУ, а в тех субъектах, где менее чем у 30 % — только на 13,9 % ($p < 0,01$) [63].

По данным Л. В. Слогодской и соавт. [51, 57, 65], Л. В. Поддубной [17], у детей с латентной туберкулезной инфекцией (ЛТИ) положительная реакция на Диаскинтест® прямо коррелировала с наличием контакта с больными — бактериовыделителями, в отличие от детей, контактировавших с больными без бактериовыделения.

Согласно Приказу Минздрава РФ от 29.12.2014 г. № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза

органов дыхания» обследованию с помощью пробы Манту подлежат все дети в возрасте до 7 лет (до первой ревакцинации БЦЖ), поскольку проба Манту позволяет судить о состоянии поствакцинного иммунитета и проводить отбор на ревакцинацию лиц с отрицательной реакцией. В последующие годы скрининг на туберкулезную инфекцию должен проводиться у детей и подростков с помощью пробы с Аллергеном туберкулезным рекомбинантным (Диаскинтест®).

Проведенные сопоставления внутрикожной пробы с Диаскинтестом® и тестом IGRA (QuantiferON-G-IT) у детей и подростков, больных туберкулезом, или с латентной туберкулезной инфекцией показали совпадение результатов тестов *in vivo* и *in vitro* более чем в 90 % случаев [66, 67]. Несовпадение касалось случаев, когда отрицательный ответ на кожный тест соответствовал результату теста IGRA, находящемуся на границе положительных и отрицательных значений. Многие западные ученые считают, что границы тестов IGRA требуют корректировки, в частности введения «зоны сомнительных результатов» [68].

В последние годы доказана высокая эффективность скринингового обследования с помощью пробы с препаратом Диаскинтест® при выявлении туберкулеза и латентной туберкулезной инфекции также у взрослых лиц из групп риска заболевания туберкулезом: больных ревматоидными заболеваниями, принимающих генно-инженерные биологические препараты [43], студентов ВУЗов, прибывших на учебу в Россию из стран с высоким бременем туберкулеза [65], работников противотуберкулезных учреждений [69, 70], больных ВИЧ-инфекцией [71, 72], поликлинических групп риска [73] и других. Проведение превентивной противотуберкулезной химиотерапии у больных ВИЧ-инфекцией, имеющих положительную реакцию на пробу с Диаскинтестом®, позволило снизить заболеваемость туберкулезом в этой группе [72].

В Москве более высокий показатель заболеваемости взрослых из групп риска (медицинских и социальных) при низкой заболеваемости туберкулезом в регионе, явился причиной изменения противотуберкулезных мероприятий. Работу сосредоточили на выявлении латентной туберкулезной инфекции с помощью пробы с Диаскинтестом® и на проведении у лиц с положительной реакцией на пробу превентивной химиотерапии с целью предотвращения развития локальных форм туберкулеза. Внедрение клинических рекомендаций по диагностике латентной туберкулезной инфекции и химиопрофилактике заболевания в группах риска у взрослых [74] привело к снижению заболеваемости, несмотря на исходно низкий уровень заболеваемости населения Москвы [71].

В Дании в Институте вакцин и сывороток создан аналогичный Диаскинтесту® препарат для внутрикожного теста. В отличие от российского препарата, в датском используется смесь белков ESAT6 и CFP10 в соотношении 1:1 [47]. Датский препарат (С-Тб) испытывался только у взрослых — при этом показана его более низкая чувствительность, чем у Диаскинтеста®, что на наш взгляд, объясняется тем, что доза 0,1 мкг С-Тб недостаточна. Чувствительность теста составила 73,9 %. У ВИЧ-инфицированных и не инфицированных чувствительность тестов была практически на одном уровне (76,7 и 69,5 %). У ВИЧ-инфицированных пациентов с числом CD4⁺ <100 клеток чувствительность С-Тб была ниже, при статистически не доказанных различиях [75]. В более ранних публикациях сравнение С-Тб с тестом QuantiFERON-G-IT показало совпа-

дающие результаты у пациентов, больных туберкулезом, в 82 % случаев [76].

В доклинических зарубежных исследованиях на животных была показана эффективность использования кожного теста с двумя этими же белками у коров: 100 % специфичность и более высокая, чем у туберкулиновой пробы чувствительность [77]. Иммуный ответ на ESAT-6 у животных тесно коррелировал с размножением бактерий и развитием патологии [46, 47, 77].

Экспериментальные данные, полученные у животных как на препарат Диаскинтест® [50], так и на датский препарат С-Тб [47], согласуются с данными клиники. Проведенное исследование Диаскинтеста® на морских свинках, не вакцинированных БЦЖ, и на животных, инфицированных вирулентным штаммом микобактерий, показало, что сначала (на 3-й неделе) появляется ответная реакция на Диаскинтест®, а позже — на туберкулин (2 TE PPD-L) [50]. Аналогичные данные получены у морских свинок, в ответ на датский препарат С-Тб [47]. У не вакцинированных БЦЖ животных реакция на С-Тб развилась вскоре после инфицирования и оставалась положительной все время прогрессирования болезни. Напротив, вакцинированные БЦЖ животные первоначально сопротивлялись развитию болезни, однако спустя 20 недель после инфицирования развилась положительная реакция на С-Тб. Таким образом, прививка БЦЖ приводит к значительной отсрочке начала болезни, что и демонстрирует реакция на кожные тесты со специфичными для микобактерий туберкулеза белками.

Эти экспериментальные данные согласуются с полученными Л. В. Слогоцкой в клинике. У вакцинированных детей реакция на Диаскинтест® появляется позже, чем на туберкулин, что объясняется тем, что вакцинация препятствует усиленной репликации микобактерий и сдерживает развитие туберкулезной инфекции. Если ребенок находится в постоянном контакте с бактериовыделителем, то такой защиты становится недостаточно и появляется положительная реакция на Диаскинтест®, что свидетельствует о прогрессировании инфекции [5].

Заключение

Инфицирование организма ребенка микобактериями туберкулеза, так же как и вакцинация туберкулезными вакцинами БЦЖ или БЦЖ-М, приводит к сенсибилизации антигенами, которые присутствуют в туберкулине. Поэтому положительная реакция на пробу Манту в условиях массовой вакцинации против туберкулеза может служить как маркером состоявшейся вакцинации, так и маркером произошедшего инфицирования вирулентными микобактериями туберкулеза. Недостаточная специфичность туберкулинодиагностики приводит к тому, что 1 % детей и подростков с положительной пробой Манту ставится на учет в группы риска, значительное число из которых подвергают необоснованной превентивной химиотерапии, которая продолжается 2 месяца и более. Иными словами, не только зря тратятся средства на проведение дополнительного обследования туберкулин-положительных лиц и на противотуберкулезные препараты с целью превентивной терапии, но и наносится определенный вред организму ребенка, превентивная терапия у которого необоснованна.

Современные методы *in vivo* — внутрикожный тест с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (Диаскинтест®) и *in vitro* — тесты IGRA, как правило, не дают ложноположительных реакций. В результате не требуется до-

полнительного обследования неинфицированных лиц, а превентивная терапия проводится только лицам с установленным высоким риском развития туберкулеза.

Современные тесты IGRA обладают высокой специфичностью, т.е. не дают ложноположительных реакций при выявлении туберкулезной инфекции. В развитых странах эти тесты используются для выявления латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ) в группах риска. Тесты IGRA, однако, отличаются рядом недостатков — они дороги, для их проведения требуется оснащенная лаборатория, квалифицированный персонал. Проведение тестов IGRA у детей затруднительно из-за внутривенных манипуляций. Границы положительного результата определены неточно, требуется их пересмотр. Для скрининга тесты IGRA из-за вышеперечисленных проблем не используют.

В России скрининг туберкулезной инфекции проводят с помощью пробы с Диаскинтестом®, которая продемонстрировала высокую эффективность — выявляемость туберкулеза у лиц с положительной реакцией на нее в десятки раз выше, чем при положительной пробе Манту.

Превентивную терапию следует проводить по результатам пробы с Диаскинтестом®, а не по пробе Манту, из-за низкой специфичности последней, особенно у вакцинированных лиц.

Чувствительность кожной пробы с Диаскинтестом® и тестов IGRA у детей высокая — выше 90 %. Отрицательные реакции отмечаются у детей, у которых туберкулез выявлен в раннем возрасте (в первые месяцы жизни), а также при оститах (осложнениях вакцинации БЦЖ). Проба Манту у больных детей раннего возраста также отрицательная из-за несформированного иммунитета. Отрицательная анергия при тяжелом течении туберкулеза и ВИЧ-инфекции проявляется при постановке всех иммунологических тестов — и тестов IGRA, и пробы с Диаскинтестом®, и пробы Манту. Это связано с тем, что при развитии туберкулеза, особенно тяжелых форм, отмечается снижение иммунитета. Высокая чувствительность теста дает основание считать, что практически все случаи туберкулеза и латентной туберкулезной инфекции с высоким риском развития заболевания будут выявлены. Тяжелые случаи заболевания, сопровождающиеся анергией, которая выражается в отрицательных реакциях на все иммунологические пробы, имеют выраженную клиническую и рентгенологическую картину, поэтому эти случаи будут выявлены при клиническом и рентгенологическом обследовании.

У взрослых, больных туберкулезом органов дыхания, чувствительность кожной пробы с Диаскинтестом® ниже, чем у детей, она находится в пределах 85 %.

У больных туберкулезом в сочетании с ВИЧ-инфекцией частота положительных реакций на пробу с Диаскинтестом® при количестве CD4⁺ Т-лимфоцитов менее 200 клеток в 1 мкл снижается до 22,0 %.

Доказана также высокая эффективность скринингового обследования взрослых лиц из групп риска заболевания туберкулезом (медицинских и социальных) постановкой пробы с Диаскинтестом® с целью выявления туберкулеза и латентной туберкулезной инфекции. Проведение превентивной противотуберкулезной химиотерапии у больных ВИЧ-инфекцией, имеющих положительную реакцию на Диаскинтест®, показано, так как позволяет снизить заболеваемость в этой группе.

Более высокая заболеваемость в группах риска у взрослых (медицинских и социальных) потребовала того, чтобы в условиях низкой заболеваемости в регионе противотуберкулезная работа сосредоточилась на выявлении

латентной туберкулезной инфекции с помощью пробы с Диаскинтестом® и на проведении превентивной химиотерапии с целью предотвращения развития локальных форм туберкулеза у лиц с положительной реакцией на пробу.

Литература

1. Аксенова ВА. Туберкулез у детей в России. Туберкулез и социально-значимые заболевания 2014; (5): 6–14.
2. Мейснер АФ, Овсянникова ЕС, Стахеева ЛБ. Туберкулинодиагностика у детей. Скрытая (латентная) туберкулезная инфекция? Проблемы туберкулеза и болезней легких 2008; 85(6): 29–33.
3. Мейснер АФ, Овсянникова ЕС, Стахеева ЛБ. Выявление туберкулеза у подростков в Москве. Проблемы туберкулеза и болезней легких 2009; 86(1): 40–4.
4. Sepulveda RL, Ferrer X, Latrach C, Sorensen RU. The influence of Calmette-Guerin bacillus immunization on the booster effect of tuberculin testing in healthy young adults. Am Rev Respir Dis. 1990; 142(1): 24–8.
5. Menzies R. Tuberculin skin testing. In: Reichman LB, Hershfield ES, ed. Tuberculosis: a comprehensive international approach. New York: Marcel Dekker. Inc., 2000. P. 279–322.
6. Horowitz HW, Luciano BB, Kadel JR, Wormser GP. Tuberculin skin test conversion in hospital employees vaccinated with bacille Calmette-Guerin: recent Mycobacterium tuberculosis infection or booster effect? Am J Infect Control. 1995; 23(3): 181–7.
7. Аксенова ВА, Леви ДТ, Закирова НР. Современные проблемы вакцинопрофилактики туберкулеза у детей. Российский вестник перинатологии и педиатрии 1999; 44(1): 3–6.
8. Richards NM, Nelson KE, Batt MD, Hackbarth D, Heidenreich JG. Tuberculin test conversion during repeated skin testing, associated with sensitivity to nontuberculous mycobacteria. Am Rev Respir Dis. 1979; 120(1): 59–65.
9. Богородская ЕМ, Белиловский ЕМ, Пучков КГ, Сенчихина ОЮ, Шамуратова ЛФ. Заболеваемость туберкулезом детей раннего возраста в городе Москве и факторы, влияющие на нее. Туберкулез и социально-значимые заболевания 2014; (5): 15–25.
10. Слогодкая ЛВ, Сенчихина ОЮ, Никитина ГВ, Богородская ЕМ. Эффективность кожного теста с аллергеном туберкулезным рекомбинантным при выявлении туберкулеза у детей и подростков Москвы в 2013 г. Педиатрическая фармакология 2015; (1): 99–103.
11. Волчкова ИЛ, Казимирова НЕ, Панкратова ЛЗ. Использование пробы с диаскинтестом для отбора на превентивную терапию детей и подростков с латентной туберкулезной инфекцией. Туберкулез и болезни легких 2015; (5): 64–5.
12. Сапожникова НВ, Истомина ЕВ, Старшинова АА, Пантелеев АМ, Журавлев ВЮ, Чернохаева ИВ и др. Выявление латентной туберкулезной инфекции среди групп риска по развитию туберкулеза. Туберкулез и болезни легких 2015; (7): 123.
13. Старшинова АА, Корнева НВ, Ананьев СМ, Довгалюк ИФ, Ильина НИ, Плахтиенко МВ и др. Сравнение диагностической значимости иммунологических тестов (T-SPOT.TB и пробы Манту с 2 ТЕ) в диагностике латентной туберкулезной инфекции у детей сотягощенным аллергологическим анамнезом. Туберкулез и болезни легких 2015; (7): 133–4.
14. Comstock GW, Edwards LB, Philip RN, Winn WA. A comparison in the United States of America of two tuberculin, PPD-S and RT23. Bull World Health Organ. 1964; 31: 161–70.
15. Diel R, Lodenkemper R, Meywald-Walter K, Gottschalk R, Nienhaus A. Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold In Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. Chest 2009; 135(4): 1010–8.
16. Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. Ann Intern Med. 2007; 146(5): 340–54.

17. Поддубная ЛВ, Шилова ЕП, Степченко ИМ, Кононенко ВГ. Эпидемиологические факторы и иммунологические пробы в формировании групп риска по заболеванию туберкулезом. *Туберкулез и болезни легких* 2015; (5): 153–4.
18. Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, Thim S, Delgado JC, Dascher CC, et al. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest.* 2000; 105(9):1317–25.
19. Thye T, Browne EN, Chinbuah MA, Gyapong J, Osei I, Owusu-Dabo E, et al. IL10 haplotype associated with tuberculin skin test response but not with pulmonary TB. *PLoS One* 2009; 4(5): e5420.
20. Nyboe J. The immediate effects of BCG revaccination. *Bull World Health Organ.* 1969; 41(1): 63–73.
21. Ferreira AA, Ferreira Mde F, Macedo EA, Cunha I, Santos SL, Reis AR, et al. BCG revaccination in school children: evolution of the lesion at the vaccination site between 48 hours and 10 weeks. *J Pediatr (Rio J).* 2002; 78(4): 289–94.
22. Styblo K. The relationship between the risk of tuberculosis infection and the risk of developing infectious tuberculosis. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis.* 1985; 60: 117–9.
23. Watkins RE, Brennan R, Plant AJ. Tuberculin reactivity and the risk of tuberculosis: a review. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000; 4(10): 895–903.
24. Berkel GM, Cobelens FG, de Vries G, Draayer-Jansen IW, Borgdorff MW. Tuberculin skin test: estimation of positive and negative predictive values from routine data. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005; 9(3): 310–6.
25. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, Bryant G, Waller S, Andersen P, et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 2003; 361(9364): 1168–73.
26. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med.* 2008; 149(3): 177–84.
27. Doherty TM, Demissie A, Olobo J, Wolday D, Britton S, Egale T, et al. Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(2): 704–6.
28. Bakir M, Millington KA, Soysal A, Deeks JJ, Efee S, Aslan Y, et al. Prognostic value of a T-cell-based, interferon-gamma biomarker in children with tuberculosis contact. *Ann Intern Med.* 2008; 149(11): 777–87.
29. Lienhardt C, Fielding K, Hane AA, Niang A, Ndao CT, Karam F, et al. Evaluation of the prognostic value of IFN- γ release assay and tuberculin skin test in household contacts of infectious tuberculosis cases in Senegal. *PLoS One* 2010; 5(5): e10508.
30. Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, Follmann F, Andersen P. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170(1): 65–9.
31. Arend SM, Thijsen SF, Leyten EM, Bouwman JJ, Franken WP, Koster BF, et al. Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175(6): 618–27.
32. Mack U, Migliori GB, Sester M, Rieder HL, Ehlers S, Goletti D, et al. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to *M. tuberculosis*? A TBNET consensus statement. *Eur Respir J.* 2009; 33(5): 956–73.
33. Diel R, Lodenkemper R, Niemann S, Meywald-Walter K, Nienhaus A. Negative and positive predictive value of a whole-blood interferon- γ release assay for developing active tuberculosis: an update. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 183(1): 88–95.
34. Lamberti M, Uccello R, Monaco MG, Muoio M, Feola D, Sannolo N, et al. Tuberculin skin test and Quantiferon test agreement and influencing factors in tuberculosis screening of healthcare workers: a systematic review and meta-analysis. *J Occup Med Toxicol.* 2015; 10: 2.
35. Rangaka MX, Wilkinson KA, Glynn JR, Ling D, Menzies D, Mwansa-Kambafwile J, et al. Predictive value of interferon- γ release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012; 12(1): 45–55.
36. Metcalfe JZ, Everett CK, Steingart KR, Cattamanchi A, Huang L, Hopewell PC, Pai M. Interferon- γ release assays for active pulmonary tuberculosis diagnosis in adults in low- and middle-income countries: systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 2011; 204 (Suppl. 4): 1120–9.
37. Kik SV, Franken WP, Mensen M, Cobelens FG, Kamphorst M, Arend SM, et al. Predictive value for progression to tuberculosis by IGRA and TST in immigrant contacts. *Eur Respir J.* 2010; 35(6): 1346–53.
38. Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, et al. Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J.* 2011; 37(1): 88–99.
39. Leung CC, Yam WC, Yew WW, Ho PL, Tam CM, Law WS, et al. T-Spot. TB outperforms tuberculin skin test in predicting tuberculosis disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 182(6): 834–40.
40. Salinas C, Pascual Erquicia S, Diez R, Aguirre U, Egurrola M, Altube L, Capelastegui A. Three-month course of rifampicin and isoniazid for the treatment of latent tuberculous infection. *Med Clin (Barc).* 2010; 135(7): 293–9.
41. Lalvani A, Pareek M. A 100 year update on diagnosis of tuberculosis infection. *Br Med Bull.* 2010; 93: 69–84.
42. Yoshiyama T, Harada N, Higuchi K, Sekiya Y, Uchimura K. Use of the QuantiFERON-TB Gold test for screening tuberculosis contacts and predicting active disease. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010; 14(7): 819–27.
43. Борисов СЕ, Лукина ГВ, Словоцкая ЛВ, Кочетков ЯА, Гунтупова ЛД, Куликовская НВ. Скрининг и мониторинг туберкулезной инфекции у ревматологических больных, получающих генно-инженерные биологические препараты. *Туберкулез и болезни легких* 2011; 88(6): 42–50.
44. Campainha S, Gomes T, Carvalho A, Duarte R. Negative predictive value of TST and IGRA in anti-TNF treated patients. *Eur Respir J.* 2012; 40(3): 790–1.
45. Pai M, Kalantri S, Menzies D. Discordance between tuberculin skin test and interferon-gamma assays. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006; 10(8): 942–3.
46. Vordermeier HM, Chambers MA, Cockle PJ, Whelan AO, Simmons J, Hewinson RG. Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 2002; 70(6): 3026–32.
47. Weldingh K, Andersen P. ESAT-6 / CFP10 skin test predicts disease in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs. *PLoS One* 2008; 3(4): e1978.
48. Киселев ВИ, Барановский ПМ, Пупышев СА, Рудых ИВ, Перельман МИ, Пальцев МА. Новый кожный тест для диагностики туберкулеза на основе рекомбинантного белка ESAT-CFP. *Молекулярная медицина* 2008; (4): 28–35.
49. Леви ДТ, Рухамина МЛ. Доклинические исследования препарата «ДИАСКИНТЕСТ®». В кн.: Пальцева МА, ред. *Кожная проба с препаратом «Диаскинтест» — новые возможности идентификации туберкулезной инфекции*, М.: Медицина; 2010. С. 65–79.
50. Бочарова ИВ, Демин АВ. Доклинические исследования специфической активности препарата «ДИАСКИНТЕСТ». В кн.: Пальцева МА, ред. *Кожная проба с препаратом «Диаскинтест» — новые возможности идентификации туберкулезной инфекции*. 2-е изд. М.: Шико; 2011. С. 114–25.
51. Словоцкая ЛВ. Эффективность кожного теста с аллергеном туберкулезным, содержащим рекомбинантный белок CFP10-ESAT6, в диагностике, выявлении и определении активности туберкулезной инфекции. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2011.
52. Словоцкая ЛИ, Литвинов ВИ, Сельцовский ПП, Шустер АМ, Мартынов ВА, Кудлай ДА. Применение кожной пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (ДИАСКИНТЕСТ®) для диагностики туберкулезной инфекции у больных с ВИЧ-инфекцией. *Пульмонология* 2011; (1): 60–4.
53. Словоцкая ЛВ, Сенчихина ОЮ, Богородская ЕМ. Чувствительность теста с аллергеном туберкулезным рекомбинантным, содержащим белок CFP10-ESAT6, у впервые выявленных больных туберкулезом детей и подростков в городе Москве.

- Туберкулез и социально-значимые заболевания. 2013; (1): 37–44.
54. Долженко ЕН. Использование аллергена туберкулезного рекомбинантного (Диаскинтеста) в выявлении активного туберкулеза у детей. Туберкулез и болезни легких. 2013; (6): 28–9.
 55. Долженко ЕН, Шейкис ЕГ, Серегина ИВ. Диагностические возможности аллергена туберкулезного рекомбинантного в скрининг-диагностике туберкулезной инфекции у детей подросткового возраста в Рязанской области. Туберкулез и болезни легких 2015; (6): 56–7.
 56. Корнева НВ, Старшинова АА, Овчинникова ЮЭ, Довгалюк ИФ. Сравнение результатов пробы Манту с 2 ТЕ и Диаскинтеста при различных проявлениях туберкулезной инфекции. Туберкулез и болезни легких 2013; (6): 49–50.
 57. Слогодкая ЛВ, Овсянкина ЕС, Кочетков ЯА, Стахеева ЛБ. Инфицированность туберкулезом детей и подростков — взгляд через столетие. Туберкулез и болезни легких 2011; (3): 21–8.
 58. Аксенова ВА, Леви ДТ. Туберкулез у детей и подростков. Био-препараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2012; (1): 21–5.
 59. Моисеева НН, Одице ВС. Опыт применения кожной пробы с диаскинтестом при массовом обследовании на туберкулез. Туберкулез и болезни легких 2015; (7): 92–3.
 60. Бармина НА, Барышников ЛА, Шурыгин АА, Рейхардт ВВ. Скрининговое обследование детей и подростков III, IV и V групп здоровья с применением нового диагностического теста. Туберкулез и болезни легких 2015; (5): 40–1.
 61. Сотнева ИБ, Павлушин АВ. Использование пробы с диаскинтестом для массового обследования детей и подростков Нижегородской области в 2013 г. Туберкулез и болезни легких 2015; (5): 173.
 62. Материалы Профильной комиссии по специальности «Фтизиатрия» при главном внештатном детском специалисте фтизиатре Минздрава России. Available from: <http://www.humanhealth.ru>.
 63. Туберкулез в Российской Федерации, 2012/2013/2014 гг. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. М.; 2015.
 64. Овсянкина ЕС, Слогодкая ЛВ, Губкина МФ. Рекомендации по применению кожной пробы с препаратом аллерген туберкулезный рекомбинантный 0,2 мкг в 0,1 мл раствор для внутрикожного введения (ДИАСКИНТЕСТ®) для идентификации туберкулезной инфекции у детей и диспансерного наблюдения в противотуберкулезных учреждениях. Методические рекомендации. М.: МНПЦБТ, 2010.
 65. Слогодкая ЛВ, Туктарова ЛМ, Волошина ЕП, Сенчихина ОЮ, Кяримова СИ. Работа в очагах туберкулезной инфекции в студенческих коллективах. Гл. 8. В кн.: Богородская ЕМ, Сельцовский ПП, ред. Очаги туберкулезной инфекции в мегаполисе: выявление, идентификация, ликвидация. М.: МНПЦБТ, 2015. С. 144–55.
 66. Слогодкая ЛВ, Иванова ДА, Кочетков ЯА, Куликовская НВ, Ванеева ТВ, Филиппов АВ. Сравнительные результаты кожно-го теста с препаратом, содержащим рекомбинантный белок CFP-10-ESAT-6 и лабораторного теста QuantiFERON-GIT. Туберкулез и болезни легких 2012 (10): 27–33.
 67. Лозовская МЭ, Белишкова ВБ, Новик ГА, Васильева ЕБ, Ключкова ЛВ, Дементьева ЕА. Диагностика туберкулеза у детей с аллергическими реакциями и заболеваниями на основе иммуноаллергических тестов. Туберкулез и болезни легких 2015; (7): 84–5.
 68. van Zyl-Smit RN, Pai M, Pech K, Meldau R, Kieck J, Juritz J, et al. Within-subject variability and boosting of T-cell interferon-gamma responses after tuberculin skin testing. Am J Respir Crit Care Med. 2009; 180(1): 49–58.
 69. Slogotskaya L, Bogorodskaya E, Litvinov V, Kudlay D, Seltsovsky P, Nikolenko N, Ivanova D. Prevalence of tuberculosis infection estimated by skin testing with recombinant protein CFP10-ESAT6 among hospital workers in Moscow. EAACI-WAO World Allergy and Asthma Congress. Available from: <https://goo.gl/JXNBDf>.
 70. Колпакова ЛВ, Аюшева ЛБ. Распространение латентной туберкулезной инфекции среди сотрудников медицинских организаций. Тезисы докладов научной программы. Московская медицина 2016; (спец. выпуск 1): 131–2.
 71. Богородская ЕМ, Борисов СЕ, Мохирева ЛВ, Ильченко АД, Синицын МВ. Профилактика туберкулеза в группах высокого риска как основа для снижения заболеваемости в г. Москве в относительно благоприятной эпидемиологической ситуации. Тезисы докладов научной программы. Московская медицина 2016; (спец. выпуск 1): 86.
 72. Синицын МВ, Аюшеева ЛБ, Колпакова ЛВ. Совершенствование химиопрофилактики туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией. Медицинский вестник Юга России 2016; (4): 45–9.
 73. Мохирева ЛВ, Данькевич ЕН, Тимофеева ЕА, Солдатенко АВ, Кузьмина ВГ, Мусаткина НВ, Скачков ВВ. Применение пробы с препаратом «Аллерген туберкулезный рекомбинантный» в поликлинических группах высокого риска по заболеванию туберкулезом у взрослого населения. В сб.: Тезисы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Туберкулез в XXI: новые задачи и современные решения». М.; 2016. С. 76–7.
 74. Богородская ЕМ, Слогодкая ЛВ, ред. Клинические рекомендации по диагностике латентной туберкулезной инфекции и химиопрофилактике заболевания в группах риска у взрослых. М.: РООИ «Здоровье человека»; 2017.
 75. Hoff ST, Peter JG, Theron G, Pascoe M, Tingskov PN, Aggerbeck H, et al. Sensitivity of C-Tb: a novel RD-1-specific skin test for the diagnosis of tuberculosis infection. Eur Respir J. 2016; 47(3): 919–28.
 76. Aggerbeck H, Gjemza R, Joshi P, Tingskov PN, Hoff ST, Boyle J, et al. Randomised clinical trial investigating the specificity of a novel skin test (C-Tb) for diagnosis of M. tuberculosis infection. PLoS One 2013; 8(5): e64215.
 77. Flores-Villalba S, Suárez-Güemes F, Espitia C, Whelan AO, Vordermeier M, Gutiérrez-Pabello JA. Specificity of the tuberculin skin test is modified by use of a protein cocktail containing ESAT-6 and CFP-10 in cattle naturally infected with Mycobacterium bovis. Clin Vaccine Immunol. 2012; 19(5): 797–803.

Об авторах

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», 107014, Российская Федерация, Москва, ул. Стромынка, д. 10.

Слогодкая Людмила Владимировна. Заведующая научно-клиническим отделом, д-р мед. наук.

Богородская Елена Михайловна. Директор, д-р мед. наук.

Сельцовский Петр Петрович. Заместитель директора по научной и организационно-методической работе, д-р мед. наук, профессор.

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

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

Адрес для переписки: Слогодкая Людмила Владимировна; lyu186@yandex.ru; Леви Диана Тимофеевна; Levi@exrmed.ru

Comparison of efficacy of Diaskintest®, a skin test with a recombinant tuberculosis allergen, used for 10 years and Mantoux tuberculin sensitivity test used for 110 years

L. V. Slogotskaya^{1,2}, E. M. Bogorodskaya^{1,2}, D. T. Levi³, P. P. Seltsovsky^{1,2}

¹ State-Financed Health Institution «Moscow Municipal Centre for Research and Practice of Tuberculosis Control of the Health Department of Moscow», Stromynka 10, Moscow 107014, Russian Federation

² Phthisiology Chair of the State-Financed Health Institution of Continuing Professional Education «Russian Medical Academy of Postgraduate Education», Stromynka 10, Moscow 107014, Russian Federation

³ 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

The article compares results reported in national and foreign literature concerning tuberculosis detection by various *in vivo* (skin tests such as the Mantoux test and Diaskintest® (a skin test with a recombinant tuberculosis allergen)) and *in vitro* methods (IGRA tests). A positive reaction to the Mantoux test, which has been used for over 100 years as part of mass immunization against tuberculosis, can be indicative of both earlier vaccination and of infection caused by virulent *Mycobacterium tuberculosis*. Given the mass scale of BCG vaccination, the positive reaction to tuberculin loses its predictive value for assessing the risk of tuberculosis. Diaskintest®, a recombinant tuberculosis allergen, was developed in Russia in early 2000s, authorized in 2008 and has been used in the national healthcare system since 2009. This is a recombinant fusion protein ESAT6-CFP10 produced using *Escherichia coli* BL21(DE3)/pCFP-ESAT. Differential diagnosis between post vaccination (BCG) and bacterial allergic reactions using Diaskintest® demonstrated high efficacy of the product — detection of tuberculosis in people with a positive reaction to the test was much higher than that of the Mantoux test. Both Diaskintest® and IGRA tests usually do not produce false negative reactions. Therefore no additional examination of non-infected people is needed, and the preventive therapy is given only to those people who have a high risk of developing tuberculosis.

Key words: BCG vaccine; Mantoux test; Diaskintest®; IGRA test; recombinant protein ESAT6-CFP10; differential diagnosis between post vaccination and bacterial allergic reactions; screening for tuberculosis infection.

For citation: Slogotskaya LV, Bogorodskaya EM, Levi DT, Seltsovsky PP. Comparison of efficacy of Diaskintest®, a skin test with a recombinant tuberculosis allergen, used for 10 years and Mantoux tuberculin sensitivity test used for 110 years. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(2): 67–77.

References

- Aksenova VA. Tuberculosis in children in Russia. *Tuberculosis and socio-important diseases* 2014; (5): 6–14 (in Russian).
- Meisner AF, Ovsyankina ES, Stakheyeva LB. Tuberculin diagnostics in children. Latent tuberculosis infection? *Problems of tuberculosis and lung diseases* 2008; 85(6): 29–33 (in Russian).
- Meisner AF, Ovsyankina ES, Stakheyeva LB. Detection of tuberculosis in Moscow adolescents. *Problems of tuberculosis and lung diseases* 2009; 86(1): 40–4 (in Russian).
- Sepulveda RL, Ferrer X, Latrach C, Sorensen RU. The influence of Calmette-Guerin bacillus immunization on the booster effect of tuberculin testing in healthy young adults. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 142(1): 24–8.
- Menzies R. Tuberculin skin testing. In: Reichman LB, Hershfield ES, ed. *Tuberculosis: a comprehensive international approach*. New York: Marcel Dekker. Inc., 2000. P. 279–322.
- Horowitz HW, Luciano BB, Kadel JR, Wormser GP. Tuberculin skin test conversion in hospital employees vaccinated with bacille Calmette-Guerin: recent *Mycobacterium tuberculosis* infection or booster effect? *Am J Infect Control*. 1995; 23(3): 181–7.
- Aksenova VA, Levi DT, Zakirova HP. Modern problems of vaccine prophylaxis of tuberculosis in children. *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics* 1999; 44(1): 3–6 (in Russian).
- Richards NM, Nelson KE, Batt MD, Hackbarth D, Heidenreich JG. Tuberculin test conversion during repeated skin testing, associated with sensitivity to nontuberculous mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*. 1979; 120(1): 59–65.
- Bogorodskaya EM, Belilovsky EM, Puchkov KG, Senchikhina OYu, Shamuratova LF. The incidence of tuberculosis in children of an early age in the city of Moscow and the factors influencing it. *Tuberculosis and socio-important diseases* 2014; (5): 15–25 (in Russian).
- Slogotskaya LV, Senchikhina OY, Nikitina GV, Bogorodskaya EM. Effectiveness of tuberculous recombinant allergen skin tests for detecting tuberculosis in children and adolescents of Moscow in 2013. *Pediatric Pharmacology* 2015; (1): 99–103 (in Russian).
- Volchkova IL, Kazimirova NE, Pankratova LE. Use of diaskintest for selection of children and adolescents with latent tuberculous infection for preventive treatment. *Tuberculosis and Lung Diseases* 2015; (5): 64–5 (in Russian).
- Sapozhnikova NV, Istomina EV, Starshinova AA, Panteleev AM, Zhuravlev VYu, Chernohaeva IV, et al. Impact of latent tuberculous infection among groups of the advanced risk of developing tuberculosis. *Tuberculosis and Lung Diseases* 2015; (7): 123 (in Russian).
- Starshinova AA, Korneva NV, Ananiev SM, Dovgalyuk IF, Ilyina NI, Plakhtienko MV, et al. Comparison of diagnostic value of immunological testing (T-SPOT. TB and Mantoux test with 2 TU) in the diagnostics of latent tuberculosis infection in children with allergy in the medical history. *Tuberculosis and Lung Diseases* 2015; (7): 133–4 (in Russian).
- Comstock GW, Edwards LB, Philip RN, Winn WA. A comparison in the United States of America of two tuberculins, PPD-S and RT23. *Bull World Health Organ*. 1964; 31: 161–70.
- Diel R, Lodenkemper R, Meywald-Walter K, Gottschalk R, Nienhaus A. Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold in tube assay, and T-Spot. TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest* 2009; 135(4): 1010–8.
- Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Intern Med*. 2007; 146(5): 340–54.
- Poddubnaya LV, Shilova EP, Stepchenko IM, Kononenko VG. Epidemiological factors and immunological tests when forming tuberculosis risk groups. *Tuberculosis and Lung Diseases* 2015; (5): 153–4 (in Russian).
- Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, Thim S, Delgado JC, Dascher CC, et al. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest*. 2000; 105(9): 1317–25.
- Thye T, Browne EN, Chinbuah MA, Gyapong J, Osei I, Owusu-Dabo E, et al. IL10 haplotype associated with tuberculin skin test response but not with pulmonary TB. *PLoS One* 2009; 4(5): e5420.
- Nyboe J. The immediate effects of BCG revaccination. *Bull World Health Organ*. 1969; 41(1): 63–73.

21. Ferreira AA, Ferreira Mde F, Macedo EA, Cunha I, Santos SL, Reis AR, et al. BCG revaccination in school children: evolution of the lesion at the vaccination site between 48 hours and 10 weeks. *J Pediatr (Rio J)*. 2002; 78(4): 289–94.
22. Styblo K. The relationship between the risk of tuberculosis infection and the risk of developing infectious tuberculosis. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis*. 1985; 60: 117–9.
23. Watkins RE, Brennan R, Plant AJ. Tuberculin reactivity and the risk of tuberculosis: a review. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000; 4(10): 895–903.
24. Berkel GM, Cobelens FG, de Vries G, Draayer-Jansen IW, Borgdorff MW. Tuberculin skin test: estimation of positive and negative predictive values from routine data. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005; 9(3): 310–6.
25. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, Bryant G, Waller S, Andersen P, et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 2003; 361(9364): 1168–73.
26. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med*. 2008; 149(3): 177–84.
27. Doherty TM, Demissie A, Olobo J, Wolday D, Britton S, Egale T, et al. Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(2): 704–6.
28. Bakir M, Millington KA, Soysal A, Deeks JJ, Efee S, Aslan Y, et al. Prognostic value of a T-cell-based, interferon-gamma biomarker in children with tuberculosis contact. *Ann Intern Med*. 2008; 149(11): 777–87.
29. Lienhardt C, Fielding K, Hane AA, Niang A, Ndao CT, Karam F, et al. Evaluation of the prognostic value of IFN- γ release assay and tuberculin skin test in household contacts of infectious tuberculosis cases in Senegal. *PLoS One* 2010; 5(5): e10508.
30. Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, Follmann F, Andersen P. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170(1): 65–9.
31. Arend SM, Thijsen SF, Leyten EM, Bouwman JJ, Franken WP, Koster BF, et al. Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 175(6): 618–27.
32. Mack U, Migliori GB, Sester M, Rieder HL, Ehlers S, Goletti D, et al. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to *M. tuberculosis*? A TBNET consensus statement. *Eur Respir J*. 2009; 33(5): 956–73.
33. Diel R, Loddenkemper R, Niemann S, Meywald-Walter K, Nienhaus A. Negative and positive predictive value of a whole-blood interferon- γ release assay for developing active tuberculosis: an update. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 183(1): 88–95.
34. Lamberti M, Uccello R, Monaco MG, Muoio M, Feola D, Sannolo N, et al. Tuberculin skin test and Quantiferon test agreement and influencing factors in tuberculosis screening of healthcare workers: a systematic review and meta-analysis. *J Occup Med Toxicol*. 2015; 10: 2.
35. Rangaka MX, Wilkinson KA, Glynn JR, Ling D, Menzies D, Mwanza-Kambafwile J, et al. Predictive value of interferon- γ release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2012; 12(1): 45–55.
36. Metcalfe JZ, Everett CK, Steingart KR, Cattamanchi A, Huang L, Hopewell PC, Pai M. Interferon- γ release assays for active pulmonary tuberculosis diagnosis in adults in low- and middle-income countries: systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis*. 2011; 204 (Suppl. 4): 1120–9.
37. Kik SV, Franken WP, Mensen M, Cobelens FG, Kamphorst M, Arend SM, et al. Predictive value for progression to tuberculosis by IGRA and TST in immigrant contacts. *Eur Respir J*. 2010; 35(6): 1346–53.
38. Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, et al. Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2011; 37(1): 88–99.
39. Leung CC, Yam WC, Yew WW, Ho PL, Tam CM, Law WS, et al. T-Spot. TB outperforms tuberculin skin test in predicting tuberculosis disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182(6): 834–40.
40. Salinas C, Pascual Erquicia S, Diez R, Aguirre U, Egurola M, Altube L, Capelastegui A. Three-month course of rifampicin and isoniazid for the treatment of latent tuberculous infection. *Med Clin (Barc)*. 2010; 135(7): 293–9.
41. Lalvani A, Pareek M. A 100 year update on diagnosis of tuberculosis infection. *Br Med Bull*. 2010; 93: 69–84.
42. Yoshiyama T, Harada N, Higuchi K, Sekiya Y, Uchimura K. Use of the QuantiFERON-TB Gold test for screening tuberculosis contacts and predicting active disease. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010; 14(7): 819–27.
43. Borisov SE, Lukina GV, Slogotskaya LV, Kochetkov YaA, Guntupova LD, Kulikovskaya NV. Tuberculosis infection screening and monitoring in rheumatic patients receiving gene engineering biological. *Tuberculosis and Lung Diseases* 2011; 88(6): 42–50 (in Russian).
44. Campainha S, Gomes T, Carvalho A, Duarte R. Negative predictive value of TST and IGRA in anti-TNF treated patients. *Eur Respir J*. 2012; 40(3): 790–1.
45. Pai M, Kalantri S, Menzies D. Discordance between tuberculin skin test and interferon-gamma assays. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006; 10(8): 942–3.
46. Vordermeier HM, Chambers MA, Cockle PJ, Whelan AO, Simmons J, Hewinson RG. Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun*. 2002; 70(6): 3026–32.
47. Weldingh K, Andersen P. ESAT-6/CFP10 skin test predicts disease in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs. *PLoS One* 2008; 3(4): e1978.
48. Kiselev VI, Baranovsky PM, Pupyshov SA, Rudykh IV, Perelman MI, Paltsev MA. Novel recombinant protein ESAT-CFP-based skin test for the diagnosis of tuberculosis. *Molecular medicine* 2008; (4): 28–35 (in Russian).
49. Levy DT, Rukhmina ML. Preclinical studies of the drug «Diaskintest®». In: Paltseva MA, ed. Skin test with the preparation «Diaskintest» — new possibilities for identification of tuberculosis infection. *M. Medicine*; 2010. P. 65–79 (in Russian).
50. Bocharova IV, Demin AV. Preclinical studies of the specific activity of the preparation «Diaskintest». In: Paltseva MA, ed. Skin test with the preparation «Diaskintest» — new possibilities of identification of tuberculosis infection. 2nd ed. Moscow: Shiko; 2011. P. 114–25 (in Russian).
51. Slogotskaya LV. Efficacy of skin test with allergen tuberculosis containing recombinant protein CFP10-ESAT6, in diagnosis, detection and detection of activity of tuberculosis infection. Moscow; 2011 (in Russian).
52. Slogotskaya LI, Litvinov VI, Seltsovsky PP, Shuster AM, Martyanov VA, Koudlay DA. A skin test with recombinant allergen of *mycobacterium tuberculosis* (DIASKINTEST®) to detect tuberculosis in HIV patients. *Russian Pulmonology* 2011; (1): 60–4 (in Russian).
53. Slogotskaya LV, Senchikhina OYu, Bogorodskaya EM. The sensitivity of the test with the allergen tuberculosis recombinant, containing the protein CFP10-ESAT6, in newly diagnosed tuberculosis patients in children and adolescents in the city of Moscow. *Tuberculosis and socio-important diseases* 2013; (1): 37–44 (in Russian).
54. Dolzhenko EN. Using tuberculosis allergen recombinant (Diaskintest) in identifying active tuberculosis. *Tuberculosis and lung diseases* 2013; (6): 28–9 (in Russian).
55. Dolzhenko EN, Shakeys EG, Seregina IV. Diagnostic opportunities of tuberculous recombinant allergen for screening for tuberculous infection in adolescents of Ryzan Region. *Tuberculosis and lung diseases* 2015; (6): 56–7 (in Russian).
56. Korneva NV, Starshinova AA, Ovchinnikova YuE, Dovgalyuk IF. Comparison of Mantoux test results with 2 TE and Diaskintest for different manifestations of tuberculosis infection. *Tuberculosis and lung diseases* 2013; (6): 49–50 (in Russian).
57. Slogotskaya LV, Ovsyankina ES, Kochetkov JA, Staheeva LB. Infection of children and adolescents with tuberculosis — a century's sight. *Tuberculosis and lung diseases* 2011; (3): 21–8 (in Russian).
58. Akseanova VA, Levi DT. Tuberculosis in children and adolescents. Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2012; (1): 21–5 (in Russian).
59. Moiseeva NN, Odinets V. S. Experience of using skin test with diaskintest in mass screening for tuberculosis. *Tuberculosis and lung diseases* 2015; (7): 92–3 (in Russian).
60. Barmina ON, Baryshnikova LA, Shurygin AA, BB Reichardt. Screening examination of children and adolescents of III, IV and V health groups with the use of a new diagnostic test. *Tuberculosis and lung diseases* 2015; (5): 40–1 (in Russian).

61. Sotneva IB, Pavlunin AV. Use of diaskintest for mass screening of children and adolescents in Nizhegorodskaya Region in 2013. *Tuberculosis and lung diseases* 2015; (5): 173 (in Russian).
62. Materials of the Profiling Commission for the specialty «Phthisiology» with the chief freelance child specialist of the TB specialist of the Ministry of Health of Russia. Available from: <http://www.humanhealth.ru> (in Russian).
63. *Tuberculosis in the Russian Federation, 2012/2013/2014. Analytical review of statistical indicators used in the Russian Federation and in the world.* Moscow; 2015 (in Russian).
64. Ovsyankina ES, Slogotskaya LV, Gubkina MF. Recommendations for the use of a skin test with the drug allergen tuberculosis recombinant 0.2 µg in a 0.1 ml solution for intradermal administration (DIASCINTEST®) to identify tuberculosis infection in children and dispensary observation in anti-tuberculosis facilities. Guidelines. Moscow: MNPTSBT; 2010 (in Russian).
65. Slogotskaya LV, Tuktarova LM, Voloshina EP, Senchikhina OYu, Kyarimova SI. Work in the foci of tuberculosis infection in student groups. In: Bogorodskaya MM, Seltsovsky PP, eds. *Foci of tuberculosis infection in the megalopolis: identification, identification, elimination.* Moscow: MNPTSBT; 2015. P. 144–55 (in Russian).
66. Slogotskaya LV, Ivanova DA, Kochetkov YA, Kulikovskaya NV, Vaneva TV, Filippov AV. Comparative results of a skin test with a preparation containing recombinant protein CFP-10-ESAT-6 and a laboratory test QuantiFERON-GIT. *Tuberculosis and lung diseases* 2012; (10): 27–33 (in Russian).
67. Lozovskaya ME, Belushkov VB, Novik GA, Vasilieva EB, Klochkova LV, Dementieva EA. Diagnosis of tuberculosis in children with allergic reactions and diseases based on immunoallergic tests. *Tuberculosis and lung diseases* 2015; (7): 84–5 (in Russian).
68. van Zyl-Smit RN, Pai M, Peprah K, Meldau R, Kieck J, Juritz J, et al. Within-subject variability and boosting of T-cell interferon-gamma responses after tuberculin skin testing. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 180(1): 49–58.
69. Slogotskaya L, Bogorodskaya E, Litvinov V, Kudlay D, Seltsovsky P, Nikolenko N, Ivanova D. Prevalence of tuberculosis infection estimated by skin testing with recombinant protein CFP10-ESAT6 among hospital workers in Moscow EAACI-WAO World Allergy and Asthma Congress. Available from: <https://goo.gl/JXNBDf>.
70. Kolpakova LV, Ayusheva LB. The spread of latent tuberculosis infection among employees of medical organizations. Abstracts of the scientific program. *Moscow Medicine* 2016; (spec. issue 1): 131–2 (in Russian).
71. Bogorodskaya EV, Borisov SE, Mokhireva LP, Ilchenko AD, Sinitsyn MV. Prevention of tuberculosis in high risk groups as a basis for reducing morbidity in Moscow in the relatively favorable epidemiological situation (abstracts of the scientific program). *Moscow Medicine* 2016; (spec. issue 1): 86 (in Russian).
72. Sinitsyn MV, Ayusheva LB, Kolpakova LV. Improvement of chemoprophylaxis of tuberculosis in patients with HIV infection. *Medical Journal of the South of Russia*; 2016: (4): 45–9 (in Russian).
73. Mohireva LV, Dankevich EN, Timofeeva EA, Soldatenko AV, Kuzmina VG, Musatkina NV, Skachkov VV. The use of a sample with the drug «Allergen tuberculosis recombinant» in high-risk polyclinic groups for tuberculosis in adults. Theses of the All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation «Tuberculosis in the 21st century: New Challenges and Modern Solutions». Moscow; 2016. P. 76–7 (in Russian).
74. Bogorodskaya EM, Slogodskaya LV, eds. *Clinical guidelines for the diagnosis of latent tuberculosis infection and chemoprophylaxis of disease in high-risk groups in adults.* Moscow: ROOI «Human Health»; 2017 (in Russian).
75. Hoff ST, Peter JG, Theron G, Pascoe M, Tingskov PN, Aggerbeck H, et al. Sensitivity of C-Tb: a novel RD-1-specific skin test for the diagnosis of tuberculosis infection. *Eur Respir J.* 2016; 47(3): 919–28.
76. Aggerbeck H, Gienza R, Joshi P, Tingskov PN, Hoff ST, Boyle J, et al. Randomised clinical trial investigating the specificity of a novel skin test (C-Tb) for diagnosis of *M. tuberculosis* infection. *PLoS One* 2013; 8(5): e64215.
77. Flores-Villalva S, Suárez-Güemes F, Espitia C, Whelan AO, Vordermeier M, Gutiérrez-Pabello JA. Specificity of the tuberculin skin test is modified by use of a protein cocktail containing ESAT-6 and CFP-10 in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin Vaccine Immunol.* 2012; 19(5): 797–803.

Authors

State-Financed Health Institution «Moscow Municipal Centre for Research and Practice of Tuberculosis Control of the Health Department of Moscow», Stromynka 10, Moscow 107014, Russian Federation.

Slogotskaya LV. Head of the Clinical Science Department. Doctor of Medical Sciences.

Bogorodskaya EM. Director. Doctor of Medical Sciences.

Seltsovsky PP. Deputy director for research and teaching activities. Doctor of Medical Sciences, professor.

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.

Contact e-mail: Slogodskaya Lyudmila Vladimirovna; lyu186@yandex.ru; Levi Diana Timofeevna; Levi@expmed.ru

Гемофильная инфекция типа *b*. Заболеемость и вакцинопрофилактика

М. В. Абрамцева, А. П. Тарасов, Т. И. Немировская, В. П. Ковтун,
В. А. Волков, А. А. Мовсесянц

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

Поступила 21.03.2017 г. Принята к публикации 14.04.2017 г.

В статье изложены современные представления об инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* типа *b* (Hib-инфекция). Рассмотрены клинико-иммунологические особенности вакцинации против Hib-инфекции. Представлены данные о заболеваемости инвазивными формами Hib-инфекции в Российской Федерации и в разных странах мира. Особое внимание уделено вакцинопрофилактике Hib-инфекции. Дана характеристика полисахаридных и конъюгированных Hib-вакцин. Рассмотрены различные схемы иммунизации, медицинские показания и противопоказания к применению, возможные побочные реакции, а также порядок проведения вакцинации.

Ключевые слова: гемофильная инфекция типа *b* (Hib-инфекция); капсульные полисахариды; вакцинопрофилактика; календарь прививок; полирибозилрибитолфосфат (PRP); полисахаридные вакцины; конъюгированные вакцины; комбинированные вакцины.

Библиографическое описание: Абрамцева МВ, Тарасов АП, Немировская ТИ, Ковтун ВП, Волков ВА, Мовсесянц АА. Гемофильная инфекция типа *b*. Заболеваемость и вакцинопрофилактика. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(2): 78–86.

Возбудитель *Haemophilus influenzae* является причиной высокой смертности у детей младше 5 лет во всем мире. В довакцинальный период 95 % серьезных заболеваний, вызываемых *H. influenzae*, приписывали серотипу *b* (Hib). Широкое использование конъюгированных вакцин привело к значительному снижению заболеваемости Hib-инфекцией в развитых и развивающихся странах.

Целью настоящей работы является освещение вопросов эволюции профилактики Hib-инфекции от пассивной иммунизации в довакцинальный период до применения комбинированных вакцин на современном этапе.

Возбудитель *H. influenzae* представляет собой неподвижные грамотрицательные плеоморфные коккобактерии, достаточно требовательные к условиям культивирования. Оптимальной питательной средой для их культивирования является шоколадный агар с обязательным содержанием двух основных факторов роста – гемина и никотинамидадениндинуклеотида (НАД). Бактерии *H. influenzae* покрыты липкой оболочкой, которая помогает им образовывать небольшие агрегаты (рис. 1).

H. influenzae впервые был идентифицирован как патоген в 1883 г. R. Koch [2], который описал мелкую грамотрицательную палочку, обнаруженную в выделениях, полученных от пациентов с конъюнктивитом. Во время пандемии инфлюэнции (гриппа) в 1889 г. R. Pfeiffer выделил из патологического секционного материала микроорганизм, который назвал бациллой Pfeiffer и описал как возбудитель гриппа [3]. В 1920 г. Winslow предложил для этого микроорганизма название *Haemophilus* [4]. Во время пандемии гриппа в 1918 г. была исключена роль *H. influenzae* в качестве возбудителя гриппа [5]. Только в 1933 г. Smith и др. доказали вирусную этиологию гриппа и указали роль *H. influenzae* в качестве причины вторичной инфекции [4].

В 1931 г. Pitman доказала, что *H. influenzae* может выделяться как в капсульных, так и в бескапсульных формах [4]. Капсулированные формы возбудителя обладают полисахаридной капсулой. Исходя из химического строения и антигенных свойств полисахаридной капсулы, выделяют 6 серотипов *H. influenzae*: *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f* [6].

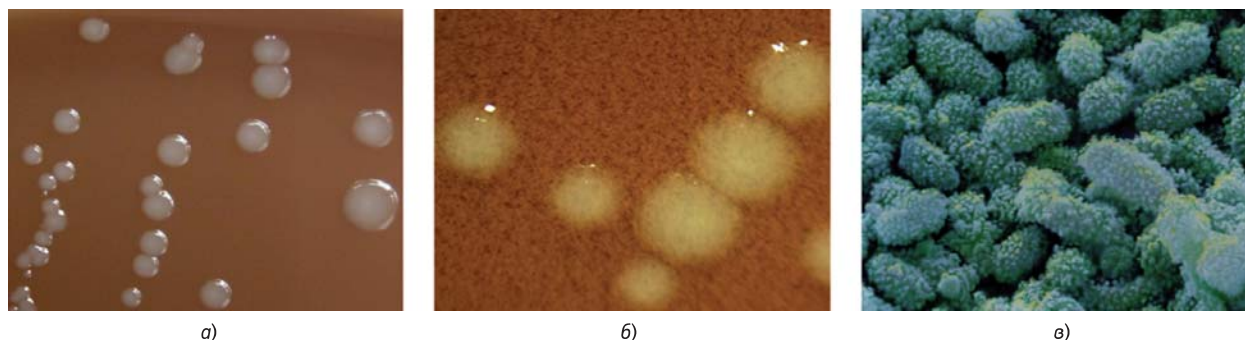


Рис. 1. *Haemophilus influenzae* типа *b* [1]: а), б) – рост на шоколадном агаре; в) изображение Hib, сделанное сканирующим электронным микроскопом (×20000).

Полисахаридная капсула является главным фактором вирулентности у многих бактерий, включая *H. influenzae*. Считается, что капсула помогает избежать защитной реакции микроорганизма на слизистых оболочках, подавляя бактерицидную и опсонизирующую активность комплемента и тем самым защищая бактерию от фагоцитоза [7]. Высокий патогенный потенциал капсулированных штаммов *H. influenzae* типа *b* сравнивали с капсулированными штаммами других серотипов [8]. Капсула Hib состоит из полирибозилрибитолфосфата (PRP), структура которого была впервые установлена в 1975 г. [9]. Есть также другие факторы, которые способствуют вирулентности Hib. Важным компонентом клеточной стенки *H. influenzae* является липополисахарид, представляющий собой эндотоксин. Липополисахарид некоторых штаммов Hib может способствовать защите микроорганизма от иммунного ответа, воздействуя на его способность выживать и размножаться в макрофагах [10]. Еще одним фактором вирулентности являются пили. Некоторые штаммы *H. influenzae* способны экспрессировать пили, которые, как известно, способствуют адгезии на клетках хозяина [11].

В довакцинальный период в 95 % случаев этиологическим фактором развития инвазивных форм гемофильной инфекции являлся возбудитель, относящийся к серотипу *b* [4]. Hib был основной причиной бактериальных менингитов и других инвазивных бактериальных болезней среди детей младше 5 лет. Примерно у одного из 200 детей младше пяти лет развивалась гемофильная типа *b* инфекция и почти в 2/3 этих случаев инфекция имела место у детей младше 18 мес. [4]. Остальная часть заболеваний приходилась на долю пяти других капсульных, а также нетипируемых бескапсульных форм возбудителя [6, 12].

Hib является облигатным патогеном, который передается от человека к человеку воздушно-капельным путем. Микроорганизм попадает в организм человека через носоглотку и колонизирует слизистую оболочку [6]. Продолжительность бессимптомной колонизации может составлять до 6 мес. В довакцинальный период возбудитель выделялся из носоглотки у 0,5–3 % здоровых детей и сравнительно редко встречался у взрослых. В тоже время нетипируемые штаммы *H. influenzae* довольно часто обнаруживаются в дыхательных путях человека. Возбудитель способен вызывать инвазивные формы инфекции. Предшествующие вирусная или микоплазменная инфекции могут служить фактором, способствующим распространению гемофильной инфекции. Микроорганизм переносится по кровеносной системе в различные части тела человека. Особенно легко инфицируются оболочки мозга. Заболеваемость Hib значительно зависит от возраста человека [4]. В 1933 г. Fothergill и Wright [13] показали, что подавляющее большинство случаев менингита, вызванного *H. influenzae*, имели место у детей младше пяти лет. Авторами также было доказано существование бактерицидной активности против *H. influenzae* в крови детей старшего возраста и взрослых, в отличие от детей младшего возраста [13].

Уровень антител, необходимый для защиты от инвазивных форм Hib-инфекции, пока точно не установлен [4]. Анализ сывороток неиммунизированных лиц в Финляндии показал, что минимальная защитная концентрация антител от Hib-менингита должна быть более 0,15 мкг/мл. Такая концентрация позволяет достичь кратковременной защиты от Hib-инфекции. Но для формирования длительной защиты необходима концентрация антител не менее 1,0 мкг/мл. Таким образом, концентрация антител, равная

1,0 мкг/мл, через 3 недели после вакцинации считается достаточной, чтобы обеспечить длительную защиту [4]. Однако отмечено, что у некоторых лиц Hib-инфекция способна развиваться даже при защитных уровнях концентрации антител [14].

Различают «инвазивные» формы Hib-инфекции, при которых возбудитель обнаруживается в жидкостях и тканях организма, стерильных в обычных условиях (кровь, спинномозговая жидкость, перитонеальная и плевральная жидкости и т.п.) и «неинвазивные» формы, к которым относится «небактериемическая» пневмония (при отсутствии возбудителя в крови), ОРЗ (ринофарингит), конъюнктивит и т.п.

К «инвазивным» формам Hib-инфекции относятся пневмония, септицемия, эпиглоттит, септический артрит, остеомиелит, перикардит, эндокардит, целлюлит [15]. Наиболее тяжелой и наиболее изученной формой Hib-инфекции является гнойный бактериальный менингит (ГБМ). Выявление и диагностика иных форм Hib-инфекции вызывают определенные затруднения [16].

В довакцинальный период на долю гнойного менингита, часто сопровождавшегося бактериемией, приходилось более 50 % от общего числа инвазивных форм; эпиглоттит составлял 17 %; пневмония — 15 %; остальные формы были представлены артритом, целлюлитом в области головы и шеи, сепсисом, остеомиелитом, перикардитом [4]. Структура заболеваемости в случаях выделения подтвержденной культуры Hib показана на рисунке 2.

До введения широкой иммунизации инвазивные формы гемофильной инфекции являлись распространенной патологией у детей младше пяти лет. В США заболеваемость Hib-менингитами у детей в возрасте 6–17 мес. составляла 122 случая на 100 тыс. по сравнению с 65 случаями на 100 тыс. детей в возрасте 18–23 мес. Резкое снижение заболеваемости наблюдалось после достижения возраста 23 мес. [17]. Уровни заболеваемости в Европе в этой возрастной категории варьировали: в Испании и во Франции — 12 и 21 случая на 100 тыс. соответственно. В Скандинавских странах уровень заболеваемости был выше: в Финляндии и Швеции — 41 и 54 случая на 100 тыс. соответственно [10]. Данные по Азиатскому региону в расчете на 100 тыс. населения разнятся: 4 случая в Таиланде, 6 случаев в Южной Корее, от 1 до 10 случаев в Китае (в зависимости от региона), 17 случаев в Саудовской Аравии, от 18 до 95 случаев на Филиппинах [17].

До начала вакцинации в России Hib-менингиты занимали второе место (17,5 %) в рейтинге гнойных менингитов, причем 95 % заболеваний приходилось на возраст 2–4 года. По расчетным данным в целом по России за один год число заболевших Hib-менингитом находилось на уровне 300 случаев, тогда как число заболевших другими генерализованными формами инфекции — на уровне 200 случаев. В России, США и других развитых странах летальность при гнойном менингите, вызванном *H. influenzae* типа *b*, составляла 3–4 %. У значительной части переболевших развивались остаточные явления (слепота, глухота, умственная отсталость и т.д.) [18].

В мировом масштабе до начала широкой вакцинации в 2000 г. число заболевших тяжелыми формами Hib-инфекции в среднем оценивалось в 8,13 млн. случаев у детей в возрасте 1–59 мес. Из них 371 тыс. случаев закончились летальным исходом [6]. К странам с самым высоким уровнем смертности от Hib-инфекции относились: Индия (72 тыс. летальных исходов в год), Нигерия (34 тыс.), Эфиопия (24 тыс.), Демократическая Республика Конго

(22 тыс.), Китай (19 тыс.), Афганистан (14 тыс.), Пакистан (13 тыс.), Бангладеш (12 тыс.), Ангола (9 тыс.), Нигер (8 тыс.) [7].

В настоящее время в мире ежегодно регистрируются по меньшей мере 3 млн. случаев инвазивной Hib-инфекции и приблизительно 386 тыс. случаев заканчиваются летальным исходом [7]. Наибольшие показатели заболеваемости и смертности, обусловленные Hib-инфекцией, имеют место в развивающихся странах. Самое тяжелое бремя ложится на детей в возрасте от 4 до 18 месяцев жизни, однако иногда болезнь может поражать младенцев младше 3 месяцев и детей старше 5 лет. На первом году жизни ребенка Hib-менингит доминирует среди всех бактериальных менингитов. Даже при условии своевременного и адекватного лечения антибиотиками, 3–20 % пациентов с Hib-менингитом погибают, а у оставшихся в живых детей часто наблюдаются серьезные неврологические осложнения (до 30–40 %) [19].

Нетипируемые штаммы *H. influenzae* являются обычной микрофлорой респираторного тракта детей и взрослых. Задokumentировано, что их носительство в носоглотке достигает 50 % у детей младше двух лет. Установлено, что нетипируемые штаммы *H. influenzae* являются причиной развития среднего отита, синусита и пневмоний. Кроме того, эти штаммы могут вызывать также и инвазивные формы заболевания, в особенности у детей младше четырех лет и у людей с иммунодефицитом [20, 21].

С повышенным риском заболеваемости Hib часто ассоциируются не только возраст, но и многие другие факторы, включая иммунодефицитные состояния, низкий социально-экономический статус, высокую плотность состава семьи. Отдельно взятое воздействие каждого из этих факторов очень трудно оценить. В мультивариантном анализе Cochi [22] было показано, что наличие переуплотненности в семье в 2,7 раза повышает вероятность заболевания Hib. Возраст, в котором происходит пик заболеваемости, зависит от географического положения страны проживания. В Западной Европе менее чем 20 % случаев заболеваний происходят до 6 мес., в то время как в развивающихся странах большинство случаев регистрируют на первом году жизни, причем от 30 до 50 % случаев имеют место к 6 мес. жизни [23, 24].

Первым специфическим средством лечения Hib-инфекции стала кроличья гипериммунная сыворотка. Затем началось широкое использование антимикробных препаратов [10]. Несмотря на открытие эффективных антимикробных агентов, в середине 1940-х гг. *H. influenzae* продолжал вызывать высокую заболеваемость и смертность. Это послужило поводом для разработки эффективных Hib-вакцин. Первое поколение Hib-вакцин содержало неконъюгированный полисахарид PRP. Полисахаридные вакцины были введены в начале 1980-х гг., но оказались слабоиммуногенными для детей младше 18 мес., т.е. в возрастной группе, в которой заболеваемость была самая высокая. Начало применения конъюгированных вакцин датируется 1985 г. Эти вакцины практически элиминировали заболеваемость в тех странах, где широко применялись [10, 25].

Полисахаридные антигены распознаются рецепторами В-клеток, но поскольку они не попадают в Т-клетки в соединении с молекулами II класса главного комплекса гистосовместимости, то результирующий иммунный ответ является Т-независимым. При Т-независимом иммунном ответе не происходит развития В-клеток памяти, и иммунологическая память не индуцируется. Таким образом,

чисто полисахаридные вакцины не обладают бустерным эффектом при ревакцинации [26, 27]. К тому же, полисахаридные антигены индуцируют сравнительно низкие титры сывороточных антител у детей младше двух лет. Причина этого явления у маленьких детей не очевидна, но предполагается, что оно связано с иммунологической незрелостью.

Первые клинические исследования были произведены с полисахаридной вакциной PRP. Уровень антителенного ответа оказался зависимым от возраста. После одной дозы от 8 до 20 % детей младше 12 мес. имели концентрацию антител более 0,15 мкг/мл и только у 2 % детей наблюдали концентрацию более 1 мкг/мл. По сравнению с этим, 45 % детей в возрасте от 12 до 17 мес. имели концентрацию антител более 1 мкг/мл и от 50 до 70 % детей в возрасте от 18 до 23 мес. демонстрировали аналогичный иммунный ответ [14]. Более чем у 90 % детей 4–5-летнего возраста был обнаружен высокий иммунный ответ, зависящий от дозы вакцины. У детей младше 12 мес. иммунный ответ на введение от 0,2 до 50 мкг PRP оказался независимым от дозы [10].

Первая полисахаридная Hib-вакцина на основе PRP была лицензирована в США в 1985 г. В Финляндии проводилось исследование эффективности менингококковой вакцины, в котором полисахаридная Hib-вакцина использовалась в качестве препарата сравнения. Вакцины вводили детям в возрасте от 3 мес. до пяти лет. У детей в возрасте от 18 до 71 мес., получавших полисахаридную Hib-вакцину, было доказано статистически значимое снижение заболеваемости бактериемическими формами Hib, а эффективность этой вакцины оценивалась в 90 %. Следует отметить, что у детей младше 18 мес. не было отмечено статистически значимой разницы в уровнях заболеваемости бактериемическими формами Hib между группами иммунизированных и неиммунизированных [28]. На основании этих данных полисахаридная Hib-вакцина была лицензирована в США для использования у детей старше 23 мес. и у детей от 18 до 23 мес. при наличии высокого риска заболевания [29]. Постмаркетинговый контроль в США продемонстрировал уровень эффективности вакцинации от 55 до 92 % у детей от 24 до 72 мес. [10]. Вместе с тем вакцина на основе PRP оказалась неэффективной при иммунизации детей младших возрастов, что было обусловлено Т-независимой природой иммунного ответа на полисахаридный антиген [30].

В 1930-х гг. Avery и Goebel показали, что иммуногенность олиго- или полисахаридных молекул может быть увеличена путем ковалентного связывания их с белковыми носителями [31]. Конъюгация с белковым носителем Hib-полисахарида оказалась эффективным методом создания вакцины, способной включать Т-клетки памяти в иммунный ответ [26]. Получаемые в ходе этого процесса конъюгированные антигены отличаются от Т-независимых полисахаридных антигенов двумя важными свойствами: во-первых, протеин-полисахаридные конъюгаты иммуногенны для детей младше 6 мес., во-вторых, они способны вызывать бустерный ответ [26]. Распознавание полисахаридных антигенов происходит в В-клетках, параллельно происходит захват белка-носителя и его презентация Т-клеткам совместно с молекулами комплекса гистосовместимости. Т-клетки, в свою очередь, обеспечивают необходимые процессы для переключения классов антител преимущественно с IgM и IgG2 на IgG1 тип, связанный с более высоким уровнем бактерицидной активности сыворотки. Кроме того, имеет место прайминг для по-

следующей ревакцинации, что выражается в очень быстром нарастании титра антител при последующей иммунизации конъюгированной вакциной. Конъюгированный антиген хорошо распознается иммунной системой младенца и стимулирует высокий антигенный ответ. Индукция Т-зависимого пути позволяет также выработать быстрый и эффективный иммунный ответ в случаях контакта с инфекционными агентами. Дополнительными преимуществами конъюгированных вакцин является создание «общественного» иммунитета при проведении массовой вакцинации детей раннего возраста и борьба с назофарингеальным носительством [32].

В качестве носителя-конъюгата используют белки бактериальной природы: столбнячный анатоксин (PRP-T), нетоксичный вариант дифтерийного токсина CRM₁₉₇ (PRP-CRM₁₉₇), белок внешней мембраны *Neisseria meningitidis* тип В (PRP-OMP). Первая конъюгированная Hib-вакцина Prohibit, содержащая PRP, конъюгированный с дифтерийным анатоксином (PRP-D), была лицензирована в США в декабре 1987 г. Несколько месяцев позже была лицензирована другая конъюгированная вакцина Hibtiter, в которой в качестве конъюгата был использован нетоксичный вариант дифтерийного токсина CRM₁₉₇ [18].

По мнению Н. Peltola, в истории вакцинологии существует лишь несколько вакцин, которые обеспечили столь же значительное падение заболеваемости в течение короткого времени, как конъюгированные Hib-вакцины [25].

В настоящее время вакцинацию против Hib-инфекции осуществляют только конъюгированными вакцинами. Препараты, выпускаемые разными производителями, различаются по природе белка-носителя, количественному содержанию PRP, используемому адъюванту. Из-за низкой иммуногенности комплекс PRP-D в настоящее время не применяется.

Введение в организм белкового носителя до иммунизации конъюгированной вакцины называется праймирование носителем. Праймирование носителем может усиливать иммунный ответ на конъюгированные Hib-вакцины. Поскольку большинство детей имеют предварительный ранний контакт с вакцинами, содержащими анатоксины дифтерии и столбняка, было выдвинуто предположение, что использование этих анатоксинов как носителей для конъюгированных Hib-вакцин может иметь иммунологические преимущества. Опыты на животных показали, что праймирование носителем усиливает иммунный ответ на введение вакцины [33]. Некоторые клинические исследования продемонстрировали усиление антительного ответа на PRP-T у детей, ранее иммунизированных бесклеточными дифтерийно-столбнячными вакцинами. Полагают, что этот эффект может быть отчасти связан с праймированием носителем.

В ходе клинического исследования в Дании 144 ребенка в возрасте от 4 до 7 мес. разделили на 3 группы. Каждая из групп получала вакцину, содержащую дифтерийный и столбнячный анатоксины и инактивированный полиовирус до, совместно или после введения PRP-T. В праймированной группе был выявлен в три раза более высокий уровень антител, чем в непраймированной. Группа, которая получала совместную вакцинацию, не отличалась по уровню антител от непраймированной группы [34]. Клиническая значимость праймирования для конъюгированных Hib-вакцин остается до конца неясной.

По мнению ВОЗ, самым эффективным методом профилактики Hib-инфекции является вакцинация. ВОЗ рекомендует включить конъюгированные вакцины во все про-

граммы иммунизации детей. Существуют три равноценные схемы иммунизации: трехкратная вакцинация (3 + 0), двукратная вакцинация и ревакцинация (2 + 1), трехкратная вакцинация и ревакцинация (3 + 1) [6]. Для стран, в которых пик заболеваемости тяжелыми формами Hib приходится на ранний возраст, предпочтение отдается схеме, предусматривающей трехкратную иммунизацию. В некоторых случаях, например, при максимальной заболеваемости среди детей старшего возраста или если уровень заболеваемости недостаточно снижается, предпочтение следует отдавать одной из схем, предусматривающей ревакцинацию. Поскольку пик заболеваемости тяжелыми формами Hib приходится на возраст 4–18 мес., вакцинацию следует начинать как можно раньше по достижению ребенком 6-недельного возраста [6].

Изучение иммуногенности конъюгированных Hib-вакцин в Финляндии показало, что среднее геометрическое титра антител детей, первично иммунизированных между 3 и 7 месяцами жизни, падает приблизительно до 0,3 мкг/мл к 18 мес. жизни. Уровень антител существенно возрастал после введения бустерной дозы и снижался до приблизительно 5 мкг/мл в течение последующих 6 мес. Тем не менее, дети между 2 и 8 годами после последней вакцинации не демонстрировали значительного снижения уровня антител, средняя концентрация антител для этой группы составляла 3,4 мкг/мл. Кроме того, дети в возрасте от 9 до 10 лет, которые получали первичную вакцинацию в сочетании с бустерной дозой, имели уровень антител в 3,6 раза выше, чем невакцинированные дети [35].

Важность непрерывной кампании вакцинации против Hib инфекции была подтверждена во время дефицита Hib-вакцины в США между ноябрем 2007 г. и мартом 2008 г. вслед за отзывом с рынка вакцины одного из производителей. В течение этого времени наблюдались вспышки заболеваемости Hib в Миннесоте и Пенсильвании. По данным департамента здравоохранения Миннесоты, это была самая крупная вспышка после 1992 г. Центр по контролю заболеваемости в США (CDC) подчеркивает, что все дети должны получать полный курс иммунизации против Hib-инфекции [10].

Анализ изменений календарей профилактических прививок развитых стран за последние годы показал, что основной мировой тенденцией является внедрение в педиатрическую практику комбинированных вакцин [16].

Осуществление массовой иммунизации комбинированными Hib-вакцинами привело к резкому снижению заболеваемости инвазивными формами инфекции, вызванной этим серотипом возбудителя. Так, в Великобритании показатель заболеваемости инвазивными формами на 100 тыс. детей в возрасте до 5 лет снизился с 34 до 0,65 случая [36], в Австралии – до 0,09 случая. В Канаде заболеваемость снизилась на 95 % [37]; а в США — на 99 % (до показателя менее 2 случаев на 100 тыс. человек) [38], при этом в 2012 г. из 3418 заболевших всех возрастов только у 30 детей младше 5 лет этиологическим фактором заболевания явилась гемофильная палочка типа *b* [39].

К 2008 г. количество стран, включивших вакцинацию против Hib-инфекции в национальный календарь прививок, достигло 136, при этом количество летальных исходов заболевания в мире у детей младше пяти лет сократилось до 203 тыс. [6]. С марта 2013 г. Hib-вакцину применяли уже в 189 странах. В среднем полный трехкратный курс вакцинации охватывал 52 % от общего числа детей, подлежащих прививкам. По регионам ВОЗ доля привитых распределялась следующим образом: Американский —

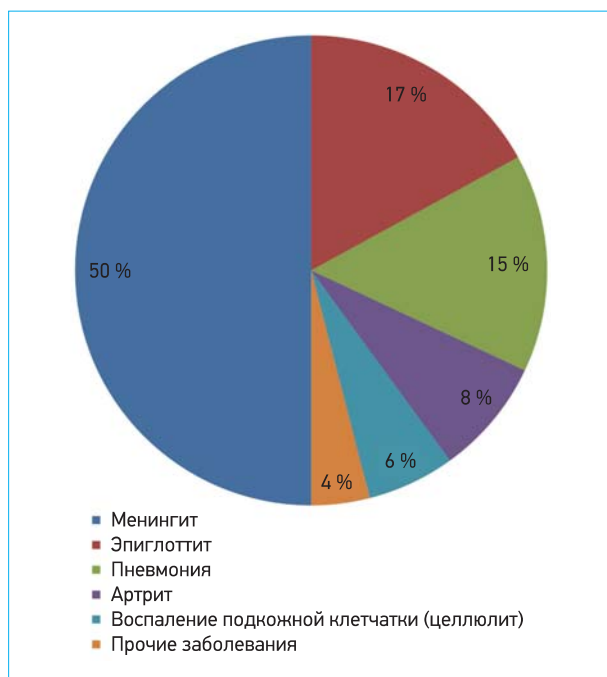


Рис. 2. Структура заболеваемости HbS-инфекцией в довакцинальный период (до 2000 г.) [4].

90 %; Европейский — 83 %; Африканский — 72 %; Средиземноморский — 60 %; Юго-Восточная Азия — 27 %; Тихоокеанский — 18 %. Вакцинация против HbS-инфекции не предусмотрена в Китае, республике Корея, КНДР, Индонезии и ограниченно проводится в Индии, что приводит к низкому проценту привитых в Азиатском регионе [40].

Несмотря на достигнутые успехи, проблема профилактики гемофильной типа *b* инфекции не теряет своей актуальности прежде всего в связи с тем, что в мире продолжает ежегодно регистрироваться до 199 тыс. ее летальных исходов, что ставит гемофильную типа *b* инфекцию по показателю летальности на 3-е место после пневмококковой и ротавирусной инфекций [18].

Недоношенных детей, находящихся в стабильном клиническом состоянии, рекомендуют вакцинировать в соответствии с хронологическим возрастом по стандартной схеме [12]. При рождении ребенка на сроке беременности менее 28 недель или при весе менее 1500 г рекомендовано использовать схему 2, 4, 6, 12 мес. [41]. Данные по иммуногенности конъюгированных HbS-вакцин у недоношенных детей противоречивы. Было показано, что у недоношенных детей, иммунизированных двумя дозами PRP-OMT в возрасте 2 и 4 мес., в 50 % случаев наблюдали уровень антител больше чем 1 мкг/мл, тогда как у доношенных детей этот уровень достигался в более чем 90 % случаев [42]. Соответственно, другое исследование показало, что значительно меньший процент недоношенных детей имеет концентрацию антител более чем 1 мкг/мл по сравнению с обычными детьми (53 % против 92 %) после иммунизации тремя дозами PRP-T [43]. Сходные данные были получены еще в одном исследовании при введении детям с гестационным возрастом 30 недель в 2 и 4 мес. двух доз вакцины PRP-T. При этом лишь у половины таких детей появились защитные уровни антител, тогда как у более зрелых недоношенных ответ был намного сильнее, практически такой же, как и у доношенных. После введе-

ния бустерной дозы в 12 мес. степень защиты сравнялась во всех группах [44]. В исследовании, направленном на изучение персистенции антительного ответа, Heath и др. [43] показали, что через 5–6 лет после 3-кратной иммунизации PRP-T среднее геометрическое титра антител недоношенных детей было достоверно ниже, чем доношенных. Оптимальная схема вакцинации для недоношенных детей не установлена. Большинство экспертов продолжают рекомендовать вакцинацию недоношенных детей конъюгированной HbS-вакциной в соответствии с их хронологическим возрастом для того, чтобы обеспечить защиту против HbS в первые 2 года жизни [10].

В России прививки против гемофильной инфекции типа *b* включены в Национальный календарь профилактических прививок с 2011 г. Иммунизации подлежат дети из группы риска: с иммунодефицитными состояниями, анатомическими дефектами, способствующими развитию инвазивных форм инфекции, онкогематологическими заболеваниями, длительно получающие иммуносупрессивную терапию, ВИЧ-инфицированные, рожденные ВИЧ-инфицированными матерями, находящиеся в домах ребенка. Прививки проводят по схеме: 3–4, 5–6 мес. с ревакцинацией в 18 мес. [45]. Более подробно схема вакцинации изложена в Методических рекомендациях МР 3.3.1.0001–10: «Инфекции, вызываемые *H. influenzae* типа *b*. Эпидемиология и вакцинопрофилактика» [16] и в инструкциях по медицинскому применению вакцин. При первичной вакцинации в возрасте старше 12 мес. препарат вводят однократно. Плановые прививки детям старше 5 лет не предусмотрены [45].

В настоящее время в Российской Федерации зарегистрированы и разрешены к применению три конъюгированные моно-HbS-вакцины: Хиберикс® производства «ГлаксоСмитКляйн Байолоджиалз» (Бельгия), АКТ-ХИБ производства «Санофи Пастер» (Франция) и вакцина гемофильная типа *b* конъюгированная, производства ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора (Россия). В качестве белка-носителя во всех трех вакцинах используется столбнячный анатоксин.

PRP входит в состав зарубежных конъюгированных комбинированных препаратов, зарегистрированных в Российской Федерации: Пентаксим, («Санофи Пастер», Франция) и Инфанрикс® Гекса, («ГлаксоСмитКляйн», Бельгия).

За последние 20 лет конъюгированные HbS-вакцины были введены миллионам детей. Сообщения о серьезных побочных эффектах немногочисленны. Отмечались отдельные упоминания о миелите, тромбоцитопении, анафилаксии, синдроме Гийена-Барре, которые связывались с назначением HbS-вакцины. Тем не менее, не было найдено адекватного доказательства подтверждения или отрицания причинной взаимосвязи вакцинации и этих заболеваний [46].

Моно- и комбинированные вакцины, содержащие HbS-компонент, обладают низкой реактогенностью. Специалистами ВОЗ, совместно с Глобальным консультативным комитетом по безопасности вакцин, опубликованы обобщенные материалы по побочному действию HbS-вакцин. Местные реакции являются обычными проявлениями на введение конъюгированной моновакцины. В течение 24 часов после вакцинации 20–25 % привитых могут испытывать чувствительность и боль в месте инъекции. Эти ре-

акции, как правило, имеют продолжительность не более 3 дней и не требуют медицинского вмешательства. У 2 % привитых вакцинация сопровождается повышением температуры [46]. В контролируемых исследованиях с участием более чем 4 тыс. младенцев не было найдено различий в типе и частоте тяжелых побочных явлений в группах детей, получивших Hib-вакцину и плацебо [46]. Частота анафилактических реакций после вакцинации находится на уровне «фоновых» показателей: 0,65–3 случая на 1 млн доз [47]. Крайне низкая реактогенность вакцины подтверждена данными мета-анализа результатов вакцинации в Канаде (257 тыс. детей), а также наблюдениями отечественных специалистов [18].

Включение Hib-компонента в состав комбинированных вакцин не привело к повышению реактогенности препарата и не сопровождалось появлением непредвиденных реакций [48].

В документах ВОЗ, отечественных и зарубежных руководствах приведены общие постоянные противопоказания: повышенная чувствительность к компонентам вакцины, включая реакцию на белок-конъюгат, развитие аллергических реакций или поствакцинальные осложнения на предшествующее введение вакцины [16]. Медицинские противопоказания к проведению профилактических прививок препаратами российского национального календаря прививок в число общих противопоказаний включают сильные общие и местные реакции на предшествующее введение данной вакцины (температура 40 °С, отек и гиперемия свыше 8 см в диаметре) или поствакцинальные осложнения [49].

В возрасте старше пяти лет прививки против гемофильной типа b инфекции показаны исключительно лицам с повышенным риском заболевания инвазивными формами. К ним относятся субъекты с функциональной и анатомической асплинией и серповидноклеточной анемией, ВИЧ-инфицированные; с дефицитом иммуноглобулинов, включая иммуноглобулин субкласса G2, дефицитом ранних компонентов комплемента, злокачественными заболеваниями крови, получающие химио- или радиационную терапию; перенесшие операции кохлеарной имплантации, трансплантацию солидных органов; реципиенты гематопоэтических стволовых клеток [18].

Инструкции по применению Hib-вакцин, зарегистрированных в России, не предусматривают проведения прививок детям старше пяти лет, подросткам и взрослым.

Эпидемиологический надзор за Hib-инфекцией – комплексное слежение за эпидемическим процессом на определенной территории и в конкретный период времени в целях организации профилактических, противоэпидемических и лечебных мероприятий. Эта работа осуществляется при совместном участии эпидемиологов, клиницистов, врачей-бактериологов, медицинских статистиков и организаторов здравоохранения [16].

Выводы

1. Заболеваемость инвазивными формами Hib-инфекции детей до 5-летнего возраста продолжает оставаться актуальной проблемой.

2. Вакцинопрофилактика является самым эффективным методом предотвращения заболеваемости Hib.

3. Полисахаридные вакцины малоэффективны у детей младше 24 месяцев.

4. Конъюгированные белково-полисахаридные вакцины не только эффективны со второго месяца жизни ребенка, но и стимулируют формирование иммунологической памяти.

5. В условиях широкой иммунизации конъюгированные вакцины против Hib-инфекции позволяют сократить заболеваемость до нескольких случаев в год.

6. Самой рациональной формой вакцинации против Hib-инфекции является включение Hib-компонента в состав комбинированных вакцин.

Литература

1. *Haemophilus influenzae* bacteria. NIBSC/SCIENCE PHOTO LIBRARY. Available from: <http://www.sciencephoto.com/media/11458/view>.
2. Богданович ТМ, Стецюк ОУ, Кречикова ОИ, Боронина ЛГ, Катосова ЛК, Фаустова МЕ. Строчунский ЛС, ред. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae*. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 2000; 2(2): 93–109.
3. Pfeiffer R. Die Aetiologie der Influenza. Z Hyg Infect. 1893; 13: 357–86.
4. *Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases: The Pink Book: Course Textbook*. 12th ed. Second Printing (May 2012). Available from: <https://goo.gl/e6EOQy>.
5. Tognotti E. Scientific triumphalism and learning from facts: bacteriology and the «Spanish flu» challenge of 1918. Soc Hist Med. 2003; 16(1): 97–110.
6. *Haemophilus influenzae* type b (Hib) Vaccination Position Paper. WHO. Weekly epidemiological record 2013; 88(39): 413–28.
7. Watt JP, Wolfson LJ, O'Brien KL, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b in children younger than 5 years: global estimates. Lancet 2009; 374(9693): 903–11.
8. Moxon ER, Kroll JS. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. Curr Top Microbiol Immunol. 1990; 150: 65–85.
9. Crisell RM, Baker RS, Dorman DE. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae*, type b. I: Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. J Biol Chem. 1975; 250(13): 4926–30.
10. Chandran A, Watt JP, Santosham M. *Haemophilus influenzae* vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, eds. *Vaccines*, 6th ed. Philadelphia, PA, Saunders-Elsevier; 2013. P. 560–621.
11. Mu XQ, Egelman EH, Bullitt E. Structure and function of Hib pili from *Haemophilus influenzae* type b. J Bacteriol. 2002; 184(17): 4868–74.
12. Briere EC, Rubin L, Moro PL, Cohn A, Clark T, Messonnier N. Prevention and control of *haemophilus influenzae* type b disease: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 2014; 63 (RR-01): 1–14.
13. Fothergill LD, Wright J. Influenza meningitis: the relation of age incidence to the bactericidal power of blood against the causal organism. J Immunol. 1933; 24: 273–84.
14. Käyhty H, Peltola H, Karanko V, Mäkelä PH. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. J Infect Dis. 1983; 147(6): 1100.
15. Notifiable diseases and mortality tables. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) 2015; 64(01): ND-1–ND-19. Available from: <https://goo.gl/YTRIV9>.
16. МР 3.3.1.0001–10 Эпидемиология и вакцинопрофилактика инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* типа b. Методические рекомендации. 2010.
17. Chandrasekar PH, Cavaliere R, Rust RS, S Swaminathan. *Haemophilus meningitis*. Available from: <https://goo.gl/NGBAEI>.
18. Озерцовский НА, Немировская ТИ. Вакцинация против гемофильной инфекции типа b в Российской Федерации и за рубежом. Эпидемиология и вакцинопрофилактика 2016; 15(1): 61–6.
19. Учайкин ВФ, Шамшева ОВ, Михайлова ЕВ, Шведова НМ. Национальный календарь профилактических прививок России: проблемы и пути их решения, результаты реализации в Са-

- ратовской области (обзор). Саратовский научно-медицинский журнал 2013; 9(2): 192–6.
20. O'Neill JM, St Geme JW 3rd, Cutter D, Adderson EE, Anyanwu J, Jacobs RF, Schutze GE. Invasive disease due to nontypeable *Haemophilus influenzae* among children in Arkansas. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(7): 3064–9.
 21. Faden H, Duffy L, Williams A, Krystofik DA, Wolf J. Epidemiology of nasopharyngeal colonization with nontypeable *Haemophilus influenzae* in the first 2 years of life. *J Infect Dis*. 1995; 172(1): 132–5.
 22. Cochi SL, Fleming DW, Hightower AW, Limpakarnjanarat K, Facklam RR, Smith JD, et al. Primary invasive *Haemophilus influenzae* type b disease: a population-based assessment of risk factors. *J Pediatr*. 1986; 108(6): 887–96.
 23. Saha SK, Baqui AH, Darmstadt GL, Ruhulamin M, Hanif M, El Arifeen S, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* type b diseases in Bangladesh, with increased resistance to antibiotics. *J Pediatr*. 2005; 146(2): 227–33.
 24. Adegbola RA, Mulholland EK, Secka O, Jaffar S, Greenwood BM. Vaccination with a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine reduces oropharyngeal carriage of *H. influenzae* type b among Gambian children. *J Infect Dis*. 1998; 177(6): 1758–61.
 25. Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13(2): 302–17.
 26. Kelly DF, Moxon ER, Pollard AJ. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Immunology* 2004; 113(2): 163–74.
 27. Käyhty H, Karanko V, Peltola H, Mäkelä PH. Serum antibodies after vaccination with *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and responses to reimmunization: no evidence of immunologic tolerance or memory. *Pediatrics* 1984; 74(5): 857–65.
 28. Peltola H, Käyhty H, Sivenon A, Mäkelä H. *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccine in children: a double-blind field study of 100,000 vaccinees 3 months to 5 years of age in Finland. *Pediatrics* 1977; 60(5): 730–7.
 29. Centers for Disease Control (CDC). Polysaccharide vaccine for prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1985; 34(15): 201–5.
 30. Dajani AS, Asmar BI, Thirumoorathi MC. Systemic *Haemophilus influenzae* disease: an overview. *J Pediatr*. 1979; 94(3): 355–64.
 31. Avery OT, Goebel WF. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins: V. The immunological specificity of an antigen prepared by combining the capsular polysaccharide of type III *Pneumococcus* with foreign protein. *J Exp Med*. 1931; 54(3): 437–47.
 32. Абрамцева МВ, Тарасов АП, Немировская ТИ. Менингококковая инфекция. Конъюгированные полисахаридные менингококковые вакцины и вакцины нового поколения. Сообщение 3. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16(1): 3–13.
 33. Granoff DM, Rathore MH, Holmes SJ, Granoff PD, Lucas AH. Effect of immunity to the carrier protein on antibody responses to *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Vaccine* 1993; 11(Suppl 1): S46–S51.
 34. Barington T, Gyhrs A, Kristensen K. Opposite effects of actively and passively acquired immunity to the carrier on responses of human infants to a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Infect Immun*. 1994; 62(1): 9–14.
 35. Mäkelä PH, Käyhty H, Leino T, Auranen K, Peltola H, Ekström N, Eskola J. Long-term persistence of immunity after immunisation with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Vaccine* 2003; 22(2): 287–92.
 36. *Haemophilus influenzae* type b (Hib): the green book. Chapter 16. Immunization against infectious disease. 2013. Available from: <https://goo.gl/vYT2f3>.
 37. Canadian immunization guide: Part 4 – Active vaccines. *Haemophilus influenzae* type b vaccine. 2014. Available from: <https://goo.gl/qgro1Z>.
 38. *Haemophilus influenzae* infections. Red Book. 29 ed.; Am Acad Pediatr. 2012. P. 345–52. Available from: <https://goo.gl/sAmyoC>.
 39. Adams DA, Jajosky RA, Ajani U, Kriseman J, Sharp P, Onwen DH, et al. Summary of notifiable diseases – United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014; 61(53): 1–121.
 40. Harris JB, Gacic-Dobo M, Eggers R, Brown DW, Sodha SV. Global routine vaccination coverage, 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014; 63(46): 1055–8.
 41. Groups with special vaccination requirements. The Australian immunization Handbook 10th, 2015. Available from: [http://www.immunise.health.gov.au/7A5C97D9-EFF7-46D7-A8B8-AB0E73A4852E/FinalDownload/DownloadId-E531F400104334DF0A8EAE21ECC539EA/7A5C97D9-EFF7-46D7-A8B8-AB0E73A4852E/internet/immunise/publishing.nsf/content/7B28E87511E08905CA257D4D001DB1F8/\\$File/Aus-Imm-Handbook.pdf](http://www.immunise.health.gov.au/7A5C97D9-EFF7-46D7-A8B8-AB0E73A4852E/FinalDownload/DownloadId-E531F400104334DF0A8EAE21ECC539EA/7A5C97D9-EFF7-46D7-A8B8-AB0E73A4852E/internet/immunise/publishing.nsf/content/7B28E87511E08905CA257D4D001DB1F8/$File/Aus-Imm-Handbook.pdf).
 42. Washburn LK, O'Shea TM, Gillis DC, Block SM, Abramson JS. Response to *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in chronically ill premature infants. *J Pediatr*. 1993; 123(5): 791–4.
 43. Heath PT, Booy R, McVernon J, Bowen-Morris J, Griffiths H, Slack MP, et al. Hib vaccination in infants born prematurely. *Arch Dis Child*. 2003; 88(3): 206–10.
 44. Kristensen K, Gyhrs A, Lausen B, Barington T, Heilmann C. Antibody response to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide conjugated to tetanus toxoid in preterm infants. *Pediatr Infect Dis J*. 1996; 15(6): 525–9.
 45. Национальный календарь профилактических прививок. Available from: <https://goo.gl/CtAqe5>.
 46. WHO information sheet observed rate of vaccine *Haemophilus influenzae* type b (Hib) vaccine. April 2012. Available from: <https://goo.gl/ezGiwx>.
 47. Bohlke K, Davis RL, Marcy SM, Braun MM, DeStefano F, Black SB, et al. Risk of anaphylaxis after vaccination of children and adolescents. *Pediatrics* 2003; 112(4): 815–20.
 48. Moro PL, Jankosky C, Menschik D, Lewis P, Duffy J, Stewart B, Shimabukuro TT. Adverse events follow *Haemophilus influenzae* type b vaccines in the Vaccine Adverse Event Reporting System, 1990–2013. *J Pediatr*. 2015; 166(4) 992–7.
 49. МУ 3.3.1.1095–02. Медицинские противопоказания к проведению профилактических прививок препаратами национального календаря прививок. Методические указания. 2002.

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.

Абрамцева Марина Витальевна. Ведущий эксперт лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Тарасов Андрей Павлович. Эксперт 1-й категории лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Немировская Татьяна Ивановна. Начальник лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Ковтун Валентина Петровна. Ведущий эксперт лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Волков Виктор Аркадьевич. Эксперт 2-й категории лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Мовсисянц Арташес Авакович. Начальник Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Абрамцева Марина Витальевна; Abramtceva@expmed.ru

Haemophilus influenzae type b. Incidence rate and preventive vaccination

M. V. Abramtseva, A. P. Tarasov, T. I. Nemirovskaya, V. P. Kovtun,
V. A. Volkov, A. A. Movsesyants

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

The article summarizes the existing knowledge on the infection caused by *Haemophilus influenzae* type b (Hib-infection). It examines clinical immunology aspects of vaccination against Hib-infection. The authors cite data on the incidence of invasive Hib-infections in the Russian Federation and other countries. Special attention is given to preventive vaccination against Hib-infection. The article describes properties of polysaccharide and conjugate vaccines against Hib-infection and examines different immunization schedules, therapeutic indications and contraindications, potential adverse reactions, and the vaccination procedure.

Key words: *haemophilus influenzae* type b (Hib-infection); capsular polysaccharides; preventive vaccination; immunization schedule; polyribosylribitolphosphate (PRP); polysaccharide vaccines; conjugate vaccines; combination vaccines.

For citation: Abramtseva MV, Tarasov AP, Nemirovskaya TI, Kovtun VP, Volkov VA, Movsesyants AA. *Haemophilus influenzae* type b. Incidence rate and preventive vaccination. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(2): 78–86.

References

1. *Haemophilus influenzae* bacteria. NIBSC/SCIENCE PHOTO LIBRARY. Available from: <http://www.sciencephoto.com/media/11458/view>.
2. Bogdanovich TM, Stecuk OU, Krechikova OI, Boronina LG, Katosova LK, Faustova ME, Strachunskij LS, ed. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy* 2000; 2(2): 93–109 (in Russian).
3. Pfeiffer R. Die Aetiologie der Influenza. *Z Hyg Infect.* 1893; 13: 357–86.
4. *Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases: The Pink Book: Course Textbook*. 12th ed. Second Printing (May 2012). Available from: <https://goo.gl/e6EOQy>.
5. Tognotti E. Scientific triumphalism and learning from facts: bacteriology and the «Spanish flu» challenge of 1918. *Soc Hist Med.* 2003; 16(1): 97–110.
6. *Haemophilus influenzae* type b (Hib) Vaccination Position Paper. WHO. *Weekly epidemiological record* 2013; 88 (39): 413–28.
7. Watt JP, Wolfson LJ, O'Brien KL, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 2009; 374(9693): 903–11.
8. Moxon ER, Kroll JS. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990; 150: 65–85.
9. Crisiel RM, Baker RS, Dorman DE. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae*, type b. I: Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. *J Biol Chem.* 1975; 250(13): 4926–30.
10. Chandran A, Watt JP, Santosham M. *Haemophilus influenzae* vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, eds. *Vaccines*, 6th ed. Philadelphia, PA, Saunders-Elsevier; 2013. P. 560–621.
11. Mu XQ, Egelman EH, Bullitt E. Structure and function of Hib pili from *Haemophilus influenzae* type b. *J Bacteriol.* 2002; 184(17): 4868–74.
12. Briere EC, Rubin L, Moro PL, Cohn A, Clark T, Messonnier N. Prevention and control of *haemophilus influenzae* type b disease: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 2014; 63 (RR-01): 1–14.
13. Fothergill LD, Wright J. Influenza meningitis: the relation of age incidence to the bactericidal power of blood against the causal organism. *J Immunol.* 1933; 24: 273–84.
14. Käyhty H, Peltola H, Karanko V, Mäkelä PH. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis.* 1983; 147(6): 1100.
15. Notifiable diseases and mortality tables. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) 2015; 64(01): ND-1–ND-19. Available from: <https://goo.gl/YTRIV9>.
16. MR 3.3.1.0001–10 Epidemiology and vaccine prevention of infections caused *Haemophilus influenzae* type b. *Methodical recommendations*. 2010 (in Russian).
17. Chandrasekar PH, Cavaliere R, Rust RS, S Swaminathan. *Haemophilus meningitis*. Available from: <https://goo.gl/NGBAEI>.
18. Ozeretskovsky NA, Nemirovskaya TI. Vaccination against *Haemophilus influenzae* type b in the Russian Federation and Abroad. *Epidemiology and Vaccinal Prevention* 2016; 15(1): 61–6 (in Russian).
19. Uchaikin VF, Shamsheva OV, Mikhailova EM, Shvedova NM. National calendar of preventive vaccination: problems, solutions and results in Saratov region. *Saratov Journal of Medical Scientific Research* 2013; 9(2): 192–6 (in Russian).
20. O'Neill JM, St Geme JW 3rd, Cutter D, Adderson EE, Anyanwu J, Jacobs RF, Schutze GE. Invasive disease due to nontypeable *Haemophilus influenzae* among children in Arkansas. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(7): 3064–9.
21. Faden H, Duffy L, Williams A, Krystofik DA, Wolf J. Epidemiology of nasopharyngeal colonization with nontypeable *Haemophilus influenzae* in the first 2 years of life. *J Infect Dis.* 1995; 172(1): 132–5.
22. Cochi SL, Fleming DW, Hightower AW, Limpakarnjanarat K, Facklam RR, Smith JD, et al. Primary invasive *Haemophilus influenzae* type b disease: a population-based assessment of risk factors. *J Pediatr.* 1986; 108(6): 887–96.
23. Saha SK, Baqui AH, Darmstadt GL, Ruhulamin M, Hanif M, El Arifien S, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* type b diseases in Bangladesh, with increased resistance to antibiotics. *J Pediatr.* 2005; 146(2): 227–33.
24. Adegbola RA, Mulholland EK, Secka O, Jaffar S, Greenwood BM. Vaccination with a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine reduces oropharyngeal carriage of *H. influenzae* type b among Gambian children. *J Infect Dis.* 1998; 177(6): 1758–61.
25. Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(2): 302–17.
26. Kelly DF, Moxon ER, Pollard AJ. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Immunology* 2004; 113(2): 163–74.
27. Käyhty H, Karanko V, Peltola H, Mäkelä PH. Serum antibodies after vaccination with *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and responses to reimmunization: no evidence of immunologic tolerance or memory. *Pediatrics* 1984; 74(5): 857–65.
28. Peltola H, Käyhty H, Sivenon A, Mäkelä H. *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccine in children: a double-blind field study of 100,000 vaccinees 3 months to 5 years of age in Finland. *Pediatrics* 1977; 60(5): 730–7.
29. Centers for Disease Control (CDC). Polysaccharide vaccine for prevention of *Haemophilus influenzae* type b disease. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1985; 34(15): 201–5.

30. Dajani AS, Asmar BI, Thirumoorhi MC. Systemic *Haemophilus influenzae* disease: an overview. *J. Pediatr.* 1979; 94(3): 355–64.
31. Avery OT, Goebel WF. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins : V. The immunological specificity of an antigen prepared by combining the capsular polysaccharide of type III *Pneumococcus* with foreign protein. *J Exp Med.* 1931; 54(3): 437–47.
32. Abramtseva MV, Tarasov AP, Nemirovskaya TI. Meningococcal disease. Meningococcal conjugate polysaccharide vaccines and new generation vaccines. Report 3. *BIOp Preparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(1): 3–13 (in Russian).
33. Granoff DM, Rathore MH, Holmes SJ, Granoff PD, Lucas AH. Effect of immunity to the carrier protein on antibody responses to *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Vaccine* 1993; 11(Suppl 1): S46–S51.
34. Barington T, Gyhrs A, Kristensen K. Opposite effects of actively and passively acquired immunity to the carrier on responses of human infants to a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Infect Immun.* 1994; 62(1): 9–14.
35. Mäkelä PH, Käyhty H, Leino T, Auranen K, Peltola H, Ekström N, Eskola J. Long-term persistence of immunity after immunisation with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Vaccine* 2003; 22(2): 287–92.
36. *Haemophilus influenzae* type b (Hib): the green book. Chapter 16. Immunization against infectious disease. 2013. Available from: <https://goo.gl/vYT2f3>.
37. Canadian immunization guide: Part 4 – Active vaccines. *Haemophilus influenzae* type b vaccine. 2014. Available from: <https://goo.gl/aggro1Z>.
38. *Haemophilus influenzae* infections. Red Book. 29 ed.; Am Acad Pediatr. 2012. P. 345–52. Available from: <https://goo.gl/sAmyoC>.
39. Adams DA, Jajosky RA, Ajani U, Kriseman J, Sharp P, Onwen DH, et al. Summary of notifiable diseases – United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2014; 61(53): 1–121.
40. Harris JB, Gacic-Dobo M, Eggers R, Brown DW, Sodha SV. Global routine vaccination coverage, 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2014; 63(46): 1055–8.
41. Groups with special vaccination requirements. The Australian immunisation Handbook 10th, 2015. Available from: [http://www.immunise.health.gov.au/7A5C97D9-EFF7-46D7-A8B8-AB0E73A4852E/FinalDownload/DownloadId-E531F400104334DF0A8EAE21ECC539EA/7A5C97D9-EFF7-46D7-A8B8-AB0E73A4852E/internet/immunise/publishing.nsf/content/7B28E87511E08905CA257D4D001DB1F8/\\$File/Aus-Imm-Handbook.pdf](http://www.immunise.health.gov.au/7A5C97D9-EFF7-46D7-A8B8-AB0E73A4852E/FinalDownload/DownloadId-E531F400104334DF0A8EAE21ECC539EA/7A5C97D9-EFF7-46D7-A8B8-AB0E73A4852E/internet/immunise/publishing.nsf/content/7B28E87511E08905CA257D4D001DB1F8/$File/Aus-Imm-Handbook.pdf).
42. Washburn LK, O'Shea TM, Gillis DC, Block SM, Abramson JS. Response to *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in chronically ill premature infants. *J Pediatr.* 1993; 123(5): 791–4.
43. Heath PT, Booy R, McVernon J, Bowen-Morris J, Griffiths H, Slack MP, et al. Hib vaccination in infants born prematurely. *Arch Dis Child.* 2003; 88(3): 206–10.
44. Kristensen K, Gyhrs A, Lausen B, Barington T, Heilmann C. Antibody response to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide conjugated to tetanus toxoid in preterm infants. *Pediatr Infect Dis J.* 1996; 15(6): 525–9.
45. National Calendar of Prophylactic Immunization. Available from: <https://goo.gl/CtAqe5> (in Russian).
46. WHO information sheet observed rate of vaccine *Haemophilus influenzae* type b (Hib) vaccine. April 2012. Available from: <https://goo.gl/ezGiwX>.
47. Bohlke K, Davis RL, Marcy SM, Braun MM, DeStefano F, Black SB, et al. Risk of anaphylaxis after vaccination of children and adolescents. *Pediatrics* 2003; 112(4): 815–20.
48. Moro PL, Jankosky C, Menschik D, Lewis P, Duffy J, Stewart B, Shimabukuro TT. Adverse events follow *Haemophilus influenzae* type b vaccines in the Vaccine Adverse Event Reporting System, 1990–2013. *J Pediatr.* 2015; 166(4) 992–7.
49. MU 3.3.1.1095–02. Medical contraindications to prophylactic immunization using vaccines of the national immunization schedule. Methodology guidelines. 2002 (in Russian).

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.

Abramtseva MV. Leading expert of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Tarasov AP. 1st professional category expert of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Nemirovskaya TI. Head of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Kovtun VP. Leading expert of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Volkov VA. 2nd professional category expert of the Laboratory of Bacterial Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Movselyants AA. Head of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Medical Sciences, professor.

Contact e-mail: Abramtseva Marina Vitalyevna; Abramtceva@expmed.ru

Анализ потребностей в стандартных образцах, предназначенных для оценки качества биологических лекарственных средств

В. И. Климов, Е. И. Саканян, Р. А. Волкова, О. В. Фадейкина, А. А. Мовсесянц,
Е. В. Лебединская, А. П. Шестакова

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

Поступила 31.03.2017 г. Принята к публикации 14.04.2017 г.

Оценка качества биологических лекарственных средств (БЛС) связана с рядом особенностей и сложностей, обусловленных вариативностью биологических систем, оказывающих влияние не только на биологические и иммунологические методы испытаний, но и на использование физических и физико-химических методов. Использование стандартных образцов вносит существенный вклад в совершенствование оценки качества БЛС. Отсутствие некоторых отраслевых стандартных образцов (ОСО) не позволяет стандартизировать соответствующую продукцию, а также оценивать сопоставимость результатов испытаний различных производителей однонаправленной (одноименной) продукции. Первым шагом для формирования национальной базы стандартных образцов лекарственных средств (СО ЛС) является изучение потребностей в СО, предназначенных для оценки качества лекарственных средств (ЛС), в том числе биологических. Результаты анализа номенклатуры СО позволили сделать вывод о том, что действующих ОСО недостаточно для оценки качества существующих БЛС. Специалисты ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России проводят исследования по разработке новых СО и аттестуют очередные серии существующих ОСО, порядок аттестации которых должен быть закреплён в создающейся нормативно-правовой базе по СО ЛС.

Ключевые слова: стандартные образцы; национальный календарь профилактических прививок; календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям; биологические лекарственные средства; перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (биологических) для медицинского применения на 2017 год.

Библиографическое описание: Климов ВИ, Саканян ЕИ, Волкова РА, Фадейкина ОВ, Мовсесянц АА, Лебединская ЕВ, Шестакова АП. Анализ потребностей в стандартных образцах, предназначенных для оценки качества биологических лекарственных средств. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(2): 87–94.

В последние десятилетия значительно повысился уровень технического развития фармацевтической и биотехнологической отраслей, расширилась номенклатура лекарственных средств, изменились требования к их качеству и методам контроля. Это определило тенденцию к переходу на расширенное использование физических, физико-химических и иммунохимических методов анализа. Данные методы анализа используются при проведении контроля широкого спектра вакцин и иммунобиологических препаратов, биотехнологических препаратов, препаратов, получаемых из крови.

Обзор зарубежных фармакопейных статей позволяет сделать заключение, что для установления подлинности, анализа чистоты и количественного определения при оценке качества биологических лекарственных средств (БЛС) ведущие фармакопеи используют именно физико-химические и иммунохимические методы, наряду с биологическими методами для оценки подлинности и специфической активности [1–3].

Однако применение этих методов при производстве и оценке качества биопрепаратов связано с рядом особенностей, в том числе с неизбежной вариативностью биологических систем, сложностью пробоподготовки при проведении анализов. В соответствии с современными требованиями [4–7] возможность использования стандартных образцов (СО) вносит существенный вклад в совершенствование разработки, стандартизации и применения БЛС.

При разработке, оценке, стандартизации и контроле биопрепаратов фармацевтическими компаниями, а также регуляторными органами широко используются биологические стандартные образцы ВОЗ. Опубликованный каталог биологических стандартных образцов ВОЗ включает более 300 наименований и обновляется каждый раз при включении новых СО или исключении устаревших образцов и эталонных реагентов [8].

Международные биологические стандартные образцы, как правило, доступны в ограниченном количестве и предназначены для калибровки вторичных стандартных образцов — региональных, национальных, отраслевых или СО менее высокого уровня [8].

В последние годы в Российской Федерации наблюдается устойчивая тенденция по исключению отраслевых стандартных образцов (ОСО) из нормативной документации и замене их на стандартные образцы предприятий (СОП), что не противоречит мировой практике [9], но и не способствует стандартизации лекарственных средств, поскольку отсутствие ОСО не позволяет оценивать сопоставимость результатов испытаний различных производителей однонаправленной (одноименной) продукции.

На настоящий момент в Перечне ОСО БЛС зарегистрировано 124 стандартных образца. В 2010 г. число действующих ОСО составляло 105 [10], в дальнейшем

количество действующих ОСО сократилось с 68 наименований в 2013 г. до 55 в 2017 г. Сокращение количества ОСО можно объяснить тем, что предприятия-производители БЛС, по-видимому, применяют международные стандартные образцы в случае их существования или калиброванные с их использованием стандартные образцы предприятий. Уменьшение количества ОСО, предназначенных для применения при оценке качества БЛС, может быть также связано и с тем, что в настоящее время отсутствуют правовая база, регламентирующая порядок разработки и использования СО, и система СО в отрасли, необходимость создания которой была определена Постановлением Правительства Российской Федерации [11].

Ранее такая правовая база и система СО существовали в ГИСК им. Л. А. Тарасевича (правопреемник — ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), в котором занимались работой по стандартизации и контролю вакцин, сывороток и других иммунобиологических лекарственных препаратов [12, 13].

В настоящее время в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России ведется постоянная работа по аттестации ОСО для иммунобиологических препаратов [14–17], а также других биологических лекарственных препаратов.

Цель работы — анализ потребностей в ОСО, предназначенных для оценки качества биологических лекарственных препаратов, поступающих на экспертизу качества в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

При оценке потребностей в СО, используемых для оценки качества ЛС биологического происхождения, был проведен анализ следующих документов [18, 19]:

- национального календаря профилактических прививок;
 - календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям;
 - перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (биологических) для медицинского применения на 2017 год.
- Результаты проведенного анализа свидетельствуют о том, что к настоящему времени отсутствуют ОСО для оценки специфической активности вакцинных препаратов против следующих инфекций:
- вирусного гепатита В;
 - пневмококковой инфекции (используются СО предприятия);
 - гемофильной инфекции;
 - лихорадки Ку;
 - холеры (используются СО предприятия);
 - вирусного гепатита А (используются СО предприятия);
 - ротавирусной инфекции (используются СО предприятия);
 - ветряной оспы (используются СО предприятия);
 - гриппа (используются СО предприятия).

В результате проведенного анализа установлено, что для надлежащего контроля качества вакцин «национального календаря профилактических прививок» и «календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям», только для оценки показателя «Специфическая активность» необходимо наличие не менее 29 ОСО. Значение аттестуемых характеристик более чем 20 наименований ОСО установлено с использованием международных стандартных образцов (МСО), в качестве которых приме-

няли стандартные образцы ВОЗ, у остальных — по результатам межлабораторной аттестации (табл. 1, 2).

В целом ежегодно необходимо проводить аттестацию или продление срока годности очередных серий 25–35 наименований ОСО, которые применяют как для оценки специфической активности вакцин (например, ОСО активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины [20, 21], ОСО вакцины желтой лихорадки [22]), так и для количественного определения белка (ОСО содержания белка для метода Лоури, ОСО содержания бычьего сывороточного альбумина), консервантов (ОСО содержания мертиолята), сорбентов (ОСО содержания алюминия) [23]. Также необходима разработка новых СО для контроля качества БЛС.

В то же время ведется научно-исследовательская работа по совершенствованию СО. Так, например, в ходе аттестации «Стандартного образца тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза» установлена возможность использования СО для оценки подлинности (видоспецифичности) не только методом иммуноэлектрофореза, но и методом иммунодиффузии в геле [24].

По основным группам лекарственных препаратов Перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2017 год [19] (иммунные сыворотки крови; иммуноглобулины, в том числе и специфические; некоторые генно-инженерные препараты; природный интерферон) в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России разработаны ОСО. Однако для некоторых БЛС ОСО отсутствуют. К ним относятся ОСО рекомбинантного интерферона альфа-2b человека, рекомбинантного филграстима человека, рекомбинантного эритропоэтина человека и ряда аллергенов.

За последние 2 года разработан и внедрен в практику работы ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России ОСО иммуноглобулина человека (для определения антикомплемментарной активности препаратов иммуноглобулинов) [25]. Использование разработанного ОСО в гармонизированной с Европейской фармакопеей (ЕФ) методике определения антикомплемментарной активности позволяет обеспечить выпуск отечественных инфузионных препаратов иммуноглобулинов человека надлежащего качества в соответствии с международными рекомендациями.

Стандартные образцы для оценки качества БЛС, планируемые к последующей разработке в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, представлены в таблице 3.

Стандартные образцы, приведенные в таблице 3, в настоящее время находятся на разных стадиях разработки.

Так, ОСО рекомбинантного эритропоэтина человека необходим для определения основного показателя качества препаратов рекомбинантного эритропоэтина (рчЭПО) — специфической активности. В Российской Федерации этот показатель определяют по влиянию препарата на стимуляцию эритропоэза, подсчитывая количество ретикулоцитов с помощью методов проточной цитометрии или световой микроскопии. Для оценки качества эритропоэтина в Российской Федерации производители (зарегистрировано 13 препаратов) применяют международный стандартный образец, европейский биологический референс-препарат или откалиброванные по ним стандартные образцы предприятия. Адекватная оценка

Таблица 1. Стандартные образцы, применяемые для определения специфической активности вакцин, приведенных в национальном календаре профилактических прививок

Вакцина против	Наличие ОСО, наименование, регистрационный номер, назначение, наличие МСО, СОП — при отсутствии ОСО
пневмококковой инфекции	ОСО — нет, МСО антигена — нет, МСО сыворотки: WHO International Standard 1st International Standard for Human Anti-pneumococcal capsule Reference Serum, NIBSC code: 007sp (СОП — есть)
дифтерии, коклюша, столбняка	ОСО противодифтерийной сыворотки для флокуляции, ОСО 42-28-249, Назначение: определение антигенной активности дифтерийного токсина/анатоксина в Международных единицах (МЕ), МСО — 2nd International Standard for Diphtheria Toxoid for use in Flocculation Test, NIBSC code: 02/176 ОСО иммуногенности адсорбированного дифтерийного анатоксина, ОСО 42-28-250, Назначение: для определения специфической (иммуногенной) активности адсорбированного дифтерийного анатоксина, выраженной в международных единицах (МЕ), в комбинированных и моновакцинах, МСО — 4th International Standard for Diphtheria Toxoid (Adsorbed), NIBSC code: 07/216 ОСО гистаминсенсibilизирующей активности (ГСА) коклюшной вакцины, ОСО 42-28-87, Назначение: количественное определение гистаминсенсibilизирующей активности производственных штаммов коклюшных бактерий <i>Bordetella pertussis</i> и коклюшного компонента ассоциированных вакцин, МСО — 5th International reference preparation of opacity WHO, NIBSC code: 76/522 ОСО иммуногенности, токсичности и лейкоцитоз-стимулирующей активности (ЛСА) коклюшной вакцины, ОСО 42-28-89, Назначение: – определение количества международных единиц иммуногенности коклюшной вакцины в моно или ассоциированных препаратах, содержащих коклюшную вакцину, при помощи метода активной защиты мышей от внутримозгового заражения живой культурой тест-штамма № 18323; – сравнительное определение токсичности коклюшной вакцины в моно или ассоциированных препаратах, содержащих коклюшную вакцину, в тесте изменения массы мышей, а также для определения ее лейкоцитозстимулирующей активности, МСО — WHO International Standard Bordetella pertussis Vaccine (Whole Cell) 41S, NIBSC code: 94/532 ОСО иммуногенности адсорбированного столбнячного анатоксина, ОСО 42-28-247, Назначение: определение специфической (иммуногенной) активности адсорбированного столбнячного анатоксина, выраженной в международных единицах (МЕ), в комбинированных и моновакцинах, МСО — 4th WHO International Standard for Tetanus Toxoid Adsorbed, NIBSC code: 08/218
гемофильной инфекции	ОСО — нет, МСО антигена: WHO 2nd International Standard for <i>Haemophilus influenzae</i> polysaccharide Polyribosyl Ribitol Phosphate (PRP), NIBSC code: 12/306 МСО сыворотки: CE Marked Material Human anti- <i>Haemophilus influenzae b</i> reference serum, NIBSC code: 09/222 (СОП — нет)
полиомиелита	ОСО вакцинного вируса полиомиелита 1 типа для определения активности моновакцины полиомиелитной пероральной 1 типа в культуре клеток HEP-2 (Цинциннати), ОСО 42-28-362, Назначение: для контроля активности вакцины моновалентной полиомиелитной пероральной 1 типа в культуре клеток HEP-2 (Цинциннати), МСО — WHO Reference reagent oral poliovaccine Sabin type 1 reference strain, NIBSC code: 01/528 ОСО вакцинного вируса полиомиелита 3 типа для определения активности моновакцины полиомиелитной пероральной 3 типа в культуре клеток HEP-2 (Цинциннати), ОСО 42-28-372, Назначение: определение специфической активности коммерческих серий моновакцины вируса полиомиелита 3 типа в культуре перевиваемых клеток HEP-2 (Цинциннати) по тканевому цитопатогенному действию (ТЦПД), МСО — WHO Reference reagent oral poliovaccine Sabin type 3 reference strain, NIBSC code: 01/532 ОСО вакцинного вируса полиомиелита 2 типа для определения активности моновакцины полиомиелитной пероральной 2 типа в культуре клеток HEP-2 (Цинциннати), ОСО 42-28-374, Назначение: определение специфической активности коммерческих серий моновакцины вируса полиомиелита 2 типа в культуре перевиваемых клеток HEP-2 (Цинциннати) по тканевому цитопатогенному действию (ТЦПД), МСО — WHO Reference reagent oral poliovaccine Sabin type 2 reference strain, NIBSC code: 01/530 ОСО вакцины полиомиелитной пероральной 1, 3 типов для определения ее активности в культуре клеток HEP-2 (Цинциннати), ОСО 42-28-434, Назначение: определение специфической активности коммерческих серий полиомиелитной вакцины 1, 3 типов в культуре перевиваемых клеток HEP-2 (Цинциннати) по тканевому цитопатогенному действию (ТЦПД) МСО — нет

Таблица 1 (окончание)

Вакцина против	Наличие ОСО, наименование, регистрационный номер, назначение, наличие МСО, СОП — при отсутствии ОСО
гепатита В	ОСО — нет, МСО — нет (СОП — есть)
туберкулеза	ОСО вакцины туберкулезной (БЦЖ/БЦЖ-М) сухой, ОСО 24-28-420, Назначение: оценка стабильности результатов испытаний вакцины туберкулезной (БЦЖ и БЦЖ-М), вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря (Имурон-вак и Уро-БЦЖ медак) по показателям «Специфическая активность» (культуральный метод), «Общее содержание бактерий» и «Дисперсность» (фотометрический метод), МСО — 1st WHO Reference reagent BCG Vaccine of Tokyo 172 sub-strain, NIBSC code: 07/272
кори, краснухи, эпидемического паротита	ОСО активности живой паротитной вакцины, ОСО 42-28-434, Назначение: оценка стабильности и приемлемости результатов определения специфической активности вируса паротита в живой паротитной вакцине, МСО — 1nd International Reference Reagent 1994 MUMPS Vaccine (live), NIBSC code: 90/534 ОСО активности вакцины против краснухи, ОСО 42-28-426, Назначение: подтверждение приемлемости результатов определения специфической активности вируса краснухи в вакцине против краснухи культуральной живой, МСО — 1st International reference reagent for rubella (live), NIBSC code: 91/688 ОСО активности живой коревой вакцины, ОСО 42-28-347, Назначение: подтверждение приемлемости результатов определения специфической активности вируса кори в живой коревой вакцине, МСО — 2nd International Reference Reagent 1994 Measles Vaccine (live), NIBSC code: 92/648
гриппа	ОСО — нет, МСО (ежегодно утверждается актуальный штамм) (СОП — есть)

Примечание. Кроме перечисленных ОСО при оценке качества вакцин используют:

- ОСО мутности бактериальных взвесей ОСО 42-28-85;
- ОСО содержания белка для метода Лоури ОСО 42-28-323;
- ОСО содержания алюминия в сорбированных препаратах ОСО 42-28-333, ОСО 42-28-333а и ОСО 42-28-423;
- ОСО содержания мертиолята в сорбированных препаратах ОСО 42-28-334а и ОСО 42-28-427;
- ОСО содержания бычьего сывороточного альбумина ОСО 42-28-328;
- ОСО содержания белкового азота ОСО 42-28-322.

указанного показателя необходима при разработке национальных требований к контролю качества препаратов рчЭПО, гармонизированных с ЕФ. Проведенные исследования позволили сделать вывод о необходимости разработки ОСО, так как только при его наличии можно адекватно сравнивать результаты различных производителей [26].

В Российской Федерации на сегодняшний день зарегистрировано более 15 зарубежных и отечественных препаратов на основе филгастима, в которых одним из основных показателей качества является оценка специфической биологической активности. Назначение ОСО активности филгастима — это оценка приемлемости результатов определения биологической активности при контроле качества субстанций и лекарственных препаратов на основе филгастима. При решении задачи по разработке ОСО активности филгастима были проведены исследования по аттестации кандидата в ОСО активности филгастима. Показатель «Биологическая активность» кандидата в ОСО оценивали по результатам межлабораторных исследований в сравнении со вторым международным стандартным образцом WHO International Standard 2nd International Standard for Granulocyte colony stimulating factor (Human rDNA derived) NIBSC-09/136. Полученные результаты свидетельствуют о том, что иссле-

дуемый образец филгастима отвечает требованиям, предъявляемым к стандартным образцам филгастима как по метрологическим характеристикам, так и по качеству препарата [27].

В настоящее время в России производят как безметиониновые, так и метиониновые формы субстанций интерферонов альфа-2b. Рекомендованный ЕФ референтный образец интерферона альфа-2b CRS I0320301 является безметиониновым и подходит для оценки подлинности методом пептидного картирования только безметиониновой формы белка.

В связи с отсутствием в настоящее время СО для оценки качества метионинового рекомбинантного интерферона альфа-2b методом пептидного картирования, его разработка и аттестация является актуальной задачей. На основании теоретической оценки была выбрана субстанция отечественного производителя — кандидат в ОСО [28].

Результаты анализа потребностей в ОСО, необходимых при проведении оценки качества БЛП, поступающих на экспертизу в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, позволили сделать вывод о том, что номенклатуры действующих ОСО недостаточно для оценки существующих и вновь разрабатываемых БЛС.

Таблица 2. ОСО, используемые при оценке качества вакцин календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям

Вакцина против	Наименование ОСО, регистрационный номер
туляремии	ОСО вакцины туляреминой живой, ОСО 42-28-398, ОСО мутности бактериальных взвесей ОСО 42-28-85
чумы	ОСО чумной вакцины, ОСО 42-28-392, ОСО мутности бактериальных взвесей ОСО 42-28-85
бруцеллеза	ОСО сыворотки бруцеллезной (срок годности закончился), ОСО вакцины бруцеллезной живой сухой, ОСО 42-28-396, ОСО мутности бактериальных взвесей ОСО 42-28-85
сибирской язвы	ОСО сибиреязвенной вакцины, ОСО 42-28-376
бешенства	ОСО специфической активности вакцины антирабической культуральной инактивированной сухой, ОСО 42-28-401
холеры	отсутствует
брюшного тифа	ОСО содержания Ви-антигена, ОСО 42-28-383
шигеллез	ОСО содержания полисахарида, ОСО 42-28-386
желтой лихорадки	ОСО вакцины желтой лихорадки, ОСО 42-28-312
менингококковой инфекции	ОСО подлинности вакцины менингококковой гр. А полисахаридной, ОСО 42-28-428 (срок годности закончился)
эпидемического паротита	См. данные, представленные в табл. 1
полиомиелита	См. данные, представленные в табл. 1

Проведенный анализ потребностей в стандартных образцах, необходимых для полноценной оценки качества БЛС, показал, что исследования по аттестации новых ОСО и очередных серий существующих ОСО являются актуальной задачей, требующей создания своей нормативной базы и организационной структуры в соответствии с законодательством Российской Федерации и Постановлением правительства.

Выводы

1. Определены стандартные образцы, необходимые для оценки качества биологических лекарственных средств, производящихся в Российской Федерации.
2. Проведенные исследования позволили определить, что в настоящее время отсутствуют ОСО для оценки специфической активности вакцинных препаратов против: вирусного гепатита В; пневмококковой инфекции (используются СО предприятия); гемофильной инфекции; лихорадки Ку; холеры (используются СО предприятия); вирусного гепатита А (используются СО предприятия); ротавирусной инфекции (используются СО предприятия); ветряной оспы (используются СО предприятия); гриппа (используются СО предприятия).

Таблица 3. Стандартные образцы, планируемые к разработке в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

№ п/п	Наименование ОСО	Назначение
1	ОСО иммуноглобулина человека содержания анти-D антител	Определение содержания анти-D антител
2	Стандартный образец рекомбинантного эритропоэтина человека	Определение специфической биологической активности
3	Стандартный образец рекомбинантного филграстима человека	Определение специфической биологической активности
4	Стандартный образец для оценки подлинности рекомбинантных интерферонов альфа-2b методом пептидного картирования	Оценка подлинности методом пептидного картирования
5	Стандартный образец аллергена из пыльцы амброзии лиофилизированный	Определение специфической биологической активности
6	Стандартный образец IgE-содержащей сыворотки к аллергену из пыльцы амброзии	Определение специфической биологической активности

3. В результате анализа перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2017 год определены лекарственные средства, для оценки качества которых отсутствуют ОСО (интерферон альфа-2b, рекомбинантные эритропоэтин и филграстим и др.).

Литература

1. *European Pharmacopoeia*. 8th ed. EDQM, 2014. Available from: <http://online.edqm.eu/entry.htm>.
2. *United States Pharmacopoeia*. 39 ed. United States Pharmacopoeial Convention; 2016.
3. *The International Pharmacopoeia (First and Second Suppl.)* 4th ed. 2011. Available from: <http://apps.who.int/phint/en/p/about>.
4. Меркулов ВА, Саканян ЕИ, Волкова РА, Климов ВИ, Шемерякина ТБ, Яшкир ВА. Фармакопейные стандартные образцы и практика их применения в отечественной системе стандартизации лекарственных средств. *Хим-фарм журн.* 2016; 50(4): 40–3.
5. Меркулов ВА, Саканян ЕИ, Климов ВИ, Шемерякина ТБ, Яшкир ВА, Бармин АВ. Современные подходы к разработке стандартных образцов для оценки качества фармацевтических субстанций. *Хим-фарм журн.* 2015; 49(11): 54–6.
6. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Климов ВИ, Саканян ЕИ, Олещук ЮВ, Меркулов ВА и др. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2016; 16(4): 229–36.
7. Бондарев ВП, Борисевич ИВ, Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения* 2013; (2): 28–32.
8. *Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004). Annex 2.* In: WHO Expert Committee on Biological Standardization: fifty-fifth report. WHO Technical Report Series 932. 2004: Geneva, Switzerland. P. 73–131.

9. Q6B Specifications: Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products guidance for industry. ICH; 1999.
10. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Мовсесянц АА, Борисевич ИВ. Опыт Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича по разработке и аттестации медицинских иммунобиологических препаратов. Стандартные образцы 2011; (4): 17–21.
11. Постановление Правительства Российской Федерации от 2 ноября 2009 г. № 884. Об утверждении Положения о Государственной службе стандартных образцов состава и свойств веществ и материалов.
12. Борисевич ИВ, Супотницкий МВ. Процай, ГИСК. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2011; (3): 6–14.
13. Фадейкина ОВ, Волкова РА, Борисевич ИВ, Мовсесянц АА, Бондарев ВП. Оценка состояния проблемы аттестации и применения отраслевых стандартных образцов медицинских иммунобиологических препаратов. Стандартные образцы 2013; (3): 58–61.
14. Абрамцева МВ, Немировская ТИ, Устинникова ОБ, Фадейкина ОВ, Волкова РА, Мовсесянц АА. Разработка и аттестация отраслевого стандартного образца для оценки подлинности вакцины менингококковой группы А полисахаридной. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16(4): 260–3.
15. Юнасова ТН, Фадейкина ОВ, Сидоренко ЕС, Суханова ЛЛ, Шитикова ОЮ, Саркисян КА и др. Разработка и изучение отраслевого стандартного образца активности вакцины против краснухи. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2015; (3): 49–53.
16. Фадейкина ОВ, Касина ИВ, Алексеева СА, Ковтун ВП, Бурдина ЕН, Ермолаева ТН и др. Применение отраслевого стандартного образца мутности бактериальных взвесей для определения общей концентрации микробных клеток в суспензиях сибиреязвенного, чумного и бруцеллезного микробов. Успехи современного естествознания 2015; (1–8): 1287–90.
17. Касина ИВ, Горьев АА, Ращепкин ЛИ, Фадейкина ОВ, Немировская ТИ, Устинникова ОБ и др. Аттестация и продление срока годности новой серии отраслевого стандартного образца специфической активности и иммуногенности вакцины туляреминой живой. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2015; (4): 32–8.
18. Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показателям: приказ Минздрава России от 21.03.2014 № 125н. Available from: <https://goo.gl/A7MfuH>.
19. Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2017 год: Распоряжение Правительства Российской Федерации от 28.12.2016 № 2885-р.
20. Мухачева АВ, Перекрест ВВ, Мовсесянц АА, Саркисян КА, Волкова РА, Фадейкина ОВ и др. Результаты переаттестации отраслевого стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2013; (4): 34–40.
21. Мухачева АВ, Перекрест ВВ, Мовсесянц АА, Саркисян КА, Бутырский АЮ, Фадейкина ОВ и др. Результаты переаттестации отраслевого стандартного образца и использование его при экспертизе качества вакцин против натуральной оспы. Эпидемиология и вакцинопрофилактика 2016; 15(6): 70–9.
22. Бархалёва ОА, Синюгина АА, Саркисян КА, Ладыженская ИП, Воробьёва МС, Фадейкина ОВ и др. Аттестация новой серии отраслевого стандартного образца вакцины желтой лихорадки для контроля специфической активности. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2013; (4): 41–7.
23. Волкова РА. Система контроля качества медицинских иммунобиологических препаратов химическими и иммунохимическими методами: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.: 2009.
24. Корнилова ОГ, Арефьева ИЛ, Коновалова ЕС, Волкова РА, Фадейкина ОВ, Кудашева ЭЮ, Мовсесянц АА. Особенности аттестации и перспективы применения стандартного образца тест системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(2): 116–21.
25. Кривых МА, Корнилова ОГ, Бунятян НД, Парамонова ЕВ, Кудашева ЭЮ, Новикова ЕВ и др. Аттестация стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомplementарной активности. Хим-фарм журн. 2016; 50(12): 61–4.
26. Яковлев АК, Гайдарова ЛА, Алпатов АН, Лобанова ТН, Постнова ЕЛ, Юрчикова ЕИ и др. Изучение принципов стандартизации фармакологической активности препаратов рекомбинантных эритропоэтинов. Стандартные образцы 2016; (1): 8–20.
27. Мотузова ЕВ, Алпатов АН, Гайдарова ЛА, Рунова ОБ, Волкова РА, Мыца ЕД и др. Разработка и аттестация отраслевого стандартного образца активности филгастима. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16(3): 172–9.
28. Устинникова ОБ, Рунова ОБ, Голощанова ЕО, Корсун ЛВ. Теоретическое обоснование выбора субстанции интерферона альфа-2b для аттестации в качестве стандартного образца для оценки подлинности методом пептидного картирования. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16(3): 161–6.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Российская Федерация, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.
 Климов Владимир Иванович. Заместитель директора Центра планирования и координации НИР, канд. мед. наук.
 Саканян Елена Ивановна. Директор Центра фармакопей и международного сотрудничества, д-р фарм. наук, профессор.
 Волкова Рауза Асхатовна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р биол. наук.
 Фадейкина Ольга Васильевна. Главный технолог Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.
 Мовсесянц Арташес Авакович. Начальник Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р мед. наук, профессор.
 Лебединская Елена Владимировна. Ведущий научный сотрудник отдела редакционно-издательской деятельности и защиты интеллектуальной собственности Центра планирования и координации НИР, канд. биол. наук.
 Шестакова Алина Павловна. Документовед отдела редакционно-издательской деятельности и защиты интеллектуальной собственности Центра планирования и координации НИР.

Адрес для переписки: Фадейкина Ольга Васильевна; Fadeikina@expmed.ru

Analysis of the demand for reference standards used in quality evaluation of biologicals

V. I. Klimov, E. I. Sakanyan, R. A. Volkova, O. V. Fadeykina, A. A. Movsesyants, E. V. Lebedinskaya, A. P. Shestakova

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

Quality evaluation of biologicals entails some specific considerations and problems associated with inherent variability of biological systems. This has implications not only for biological and immunological test methods, but for physical and physico-chemical methods as well. Usage of reference standards (RSs) has an important role to play in the improvement of evaluation of biologicals' quality. Absence of some industry RSs, which have the status of national RSs, makes it impossible to standardize corresponding products and to assess comparability of test results obtained by different manufacturers for similar (similarly named) products. The first step in the creation of the national system of RSs for medicines is the analysis of the demand for RSs used in quality evaluation of medicines, including biologicals. The analysis of the range of RSs demonstrated that existing industry RSs are not sufficient for performing quality evaluation of available biologicals. At present new industry RSs are being developed.

Key words: reference standards; national calendar of preventive vaccinations; calendar of preventive vaccinations for epidemiological indications; biologicals; list of essential medicines for medical use for 2017.

For citation: Klimov VI, Sakanyan EI, Volkova RA, Fadeykina OV, Movsesyants AA, Lebedinskaya EV, Shestakova A P. Analysis of the demand for reference standards used in quality evaluation of biologicals. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(2): 87–94.

References

- European Pharmacopoeia. 8th ed. EDQM, 2014. Available from: <http://online.edqm.eu/entry.htm>.
- United States Pharmacopoeia. 39 ed. United States Pharmacopoeial Convention; 2016.
- The International Pharmacopoeia (First and Second Supl.) 4th ed. 2011. Available from: <http://apps.who.int/phint/en/p/about>.
- Merkulov VA, Sakanyan EI, Volkova RA, Klimov VI, Shemeryankina TB, Yashkir VA. Pharmacopoeia standard samples and their practical application in the national drug standardization system. *Pharm Chem J.* 2016; 50(4): 258–61 (in Russian).
- Merkulov VA, Sakanyan EI, Klimov VI, Shemeryankina TB, Yashkir VA, Barmin AV. Modern approaches to development of reference substances for evaluation of the quality of pharmaceuticals. *Pharm Chem J.* 2015; 49(11): 54–6 (in Russian).
- Volkova RA, Fadeykina OV, Klimov VI, Sakanyan EI, Olefir YuV, Merkulov VA, et al. Topical issues related to reference standards in the sphere of circulation of biological products. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(4): 229–36 (in Russian).
- Bondarev VP, Borisevich IV, Volkova RA, Fadeykina OV. Industry reference standards certification for the control of medical immunobiological preparations. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2013; (2): 28–32 (in Russian).
- Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004). Annex 2. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization: fifty-fifth report. WHO Technical Report Series 932. 2004: Geneva, Switzerland. P. 73–131.
- Q6B Specifications: Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products guidance for industry. ICH; 1999.
- Volkova RA, Fadeykina OV, Movsesyants AA, Borisevich IV. The experience of L. A. Tarasevich State Scientific Research Institute for Standardization and Control of Medical and Biological Products in the development and certification of certified reference materials of medical immunobiological products. *Reference Materials* 2011; (4): 17–21 (in Russian).
- Resolution of the Government of the Russian Federation, November 2, 2009, № 884. On approval of the Position of the State service of reference materials of composition and properties of substances and materials (in Russian).
- Borisevich IV, Supotnitskiy MV. Farewell to Tarasevich State Control Institute. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2011; (3): 6–14 (in Russian).
- Fadeykina OV, Volkova RA, Borisevich IV, Movsesyants AA, Bondarev VP. Assessment of the current state of certification and use of branch reference materials of medical immunobiological preparations. *Sertified Materials* 2013; (3): 58–61 (in Russian).
- Abramtseva MV, Nemirovskaya TI, Ustinnikova OB, Fadeykina OV, Volkova RA, Movsesyants AA. The development and certification of the industrial reference standard for identification of meningococcal polysaccharide vaccine group A. Genotyping problems of microorganisms. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(4): 260–3 (in Russian).
- Yunasoova TN, Fadeykina OV, Sidorenko ES, Sukhanova LL, Shitikova OYu, Sarkisyan KA, et al. Evaluation of branch reference standard of activity vaccine for rubella. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2015; (3): 49–53 (in Russian).
- Fadeykina OV, Kasina IV, Alekseeva SA, Kovtun VP, Burdina EN, Ermolaeva TN, et al. Application of branch standard sample of bacterial suspension opacity for microbial cells total concentration determination in suspension of anthrax, plague and brucellosis bacteria. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya* 2015; (1–8): 1287–90 (in Russian).
- Kasina IV, Goryaev AA, Rashchepkin LI, Fadeykina OV, Nemirovskaya TI, Ustinnikova OB, et al. Certification and shelf-life extension of a new batch of the branch reference standard for live tularemia vaccine's specific activity and immunogenicity. *Biopreparation. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2015; (4): 32–8 (in Russian).
- On the approval of the national calendar of preventive vaccinations and the calendar of preventive vaccinations for epidemiological indications: the order of the Ministry of Health of the Russian Federation of March 21, 2014 N 125n. Available from: <https://goo.gl/A7MfuH> (in Russian).
- On the approval of the list of essential medicines for medical use for 2017: disposition. Government order of the Russian Federation from December 28, 2016 N 2885-p (in Russian).
- Mukhacheva AV, Perekrst VV, Movsesyants AA, Sarkisyan KA, Volkova RA, Fadeykina OV, et al. Results of re-certification of the industry reference standard for determination of potency, specificity and necrotic activity of the smallpox vaccine. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2013; (4): 34–40 (in Russian).
- Mukhacheva AV, Perekrst VV, Movsesyants AA, Sarkisyan KA, Butyrsky AYU, Fadeykina OV, et al. Re-certification of the industry reference standard and its use in quality evaluation of smallpox vaccines. *Epidemiology and vaccinal prevention* 2016; 15(6): 70–9 (in Russian).

22. Barkhaleva OA, Sinyugina AA, Sarkisyan KA, Ladyzhenskaya IP, Vorobyeva MS, Fadeykina OV, et al. Certification of a new batch of the industry reference standard for determination of specific activity of the yellow fever vaccine. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2013; (4): 41–7 (in Russian).
23. Volkova RA. Quality control of medical immunobiological preparations of chemical and immunochemical methods. *Dr Biol Sci [thesis]*. Moscow; 2009 (in Russian).
24. Kornilova OG, Arefyeva IL, Konovalova ES, Volkova RA, Fadeykina OV, Kudasheva EY, Movsesyants AA. Certification and potential future use of the reference standard designed for the test system for determination of the fractional (antigenic) composition of human serum products by immunoelectrophoresis. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(2): 116–21 (in Russian).
25. Krivykh MA, Kornilova OG, Bunyatyan ND, Paramonova EV, Kudasheva EYU, Novikova EV, et al. Certification of standard samples of human immunoglobulin for determination of anticomplementary activity. *Pharm Chem J*. 2016; 50(12): 61–4 (in Russian).
26. Yakovlev AK, Gayderova LA, Alpatova NA, Lobanova TN, Postnova EL, Yurchikova EI, et al. Studying of the standardization principles of pharmacological activity of recombinant erythropoietin preparations. *Sertified Materials* 2016; (1): 8–20 (in Russian).
27. Motuzova EV, Alpatova NA, Gayderova LA, Runova OB, Volkova RA, Mytsa ED, et al. Development and certification of an industrial reference standard for determination of filgrastim activity. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(3): 172–8 (in Russian).
28. Ustinnikova OB, Runova OB, Goloschapova EO, Korsun LV. Theoretical rationale for the choice of interferon alfa-2b substance to be certified as a reference standard for identification test by peptide mapping. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(3): 161–6 (in Russian).

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.

Klimov VI. Deputy Director of the Centre for Planning and Coordination of Scientific Activities. Candidate of Medical Sciences.

Sakanyan EI. Director of the Centre of Pharmacopoeia and International Collaboration. Doctor of Pharmaceutical Sciences, professor.

Volkova RA. Head of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Biological Sciences.

Fadeykina OV. Chief technologist of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Movsesyants AA. Head of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Medical Sciences, professor.

Lebedinskaya EV. Leading research associate of the Department for Editorial and Publishing Activities, and Intellectual Property Protection of the Centre for Planning and Coordination of Scientific Activities. Candidate of Biological Sciences.

Shestakova AP. Records manager of the Department for Editorial and Publishing Activities, and Intellectual Property Protection of the Centre for Planning and Coordination of Scientific Activities.

Contact e-mail: Fadeykina Olga Vasil'evna; Fadeikina@expmed.ru

Изучение биологической и генетической стабильности штамма № 205 вируса клещевого энцефалита, применяемого для производства вакцин клещевого энцефалита ЭнцеВир, ЭнцеВир Нео детский

М. С. Воробьева¹, Г. М. Игнатьев², Н. А. Нетесова³, Е. В. Отрашевская⁴, Н. Х. Ставицкая⁵,
М. С. Щербинина¹, К. А. Саркисян¹, В. А. Шевцов¹, А. В. Рукавишников¹, В. П. Бондарев¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
127051, Российская Федерация, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

² Федеральное государственное унитарное предприятие
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток
и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России, 198320,
Российская Федерация, Санкт-Петербург, г. Красное Село, ул. Свободы, д. 52
³ НПО «СибЭнзим», 630117, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Академика Тимакова, д. 2/12

⁴ Федеральное государственное унитарное предприятие
«Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
127473, Российская Федерация, Москва, 2-й Волконский переулок, д. 10

⁵ Филиал федерального государственного унитарного предприятия
«Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
«НПО «Вирион», 634040, Российская Федерация, г. Томск, ул. Ивановского, д. 8

Поступила 04.10.2016 г. Принята к публикации 14.04.2017 г.

Представлены результаты многолетнего изучения биологической и генетической стабильности штамма № 205 вируса клещевого энцефалита, используемого в ФГУП «НПО «Микроген» для производства культуральных инактивированных очищенных сорбированных вакцин клещевого энцефалита: ЭнцеВир (для вакцинации взрослых) и ЭнцеВир Нео детский (для вакцинации детей). Биологическую стабильность штамма № 205 изучали на этапах получения посевных серий вируса при пассажах на аутбредных белых мышах: исходный производственный штамм № 205, производственный «штаммовый запас». Лиофилизаты производственных посевных серий изучали на различных сроках хранения при температуре минус 20 °С (до 9 лет и более). Определяли показатели биологической активности (титры вируса клещевого энцефалита (КЭ) в Ig LD₅₀/мл) при различных способах заражения аутбредных белых мышей, а также определяли подлинность (специфичность) штамма № 205 по отношению к эталонному в реакции биологической нейтрализации (РБН) в соответствии с требованиями фармакопейной статьи предприятия (ФСП) на вышеуказанные вакцины КЭ. Эти же материалы, а также одну из серий вакцины КЭ, полученной на основе производственного «штаммового запаса» вируса КЭ штамма № 205 (лиофилизат 1986 г.), изучали на сохранность генетической стабильности в процессе пассирования и длительного хранения методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования. Впервые показана биологическая и генетическая стабильность вируса КЭ, штамм № 205, в процессе производства вакцин КЭ.

Ключевые слова: клещевой энцефалит; вакцинация; производство вакцин клещевого энцефалита; биологическая и генетическая стабильность; подлинность в реакции биологической нейтрализации; пассажи через мозг аутбредных белых мышей; полимеразная цепная реакция; праймеры; секвенирование.

Библиографическое описание: Воробьева МС, Игнатьев ГМ, Нетесова НА, Отрашевская ЕВ, Ставицкая НХ, Щербинина МС, Саркисян КА, Шевцов ВА, Рукавишников АВ, Бондарев ВП. Изучение биологической и генетической стабильности штамма № 205 вируса клещевого энцефалита, применяемого для производства вакцин клещевого энцефалита ЭнцеВир, ЭнцеВир Нео детский. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(2): 95–102.

История изучения клещевого энцефалита (КЭ) насчитывает более 80 лет, однако данное заболевание остается проблемой здравоохранения стран Центральной и Восточной Европы, России, а так же Китая, Монголии и Японии [1, 2]. Распространение вируса клещевого энцефалита на двух континентах определяет его генетическое разнообразие. К настоящему времени с помощью молекулярно-генетических исследований подтверждена циркуляция в природных очагах КЭ 3 субтипов (генотипов) вируса КЭ — европейского, дальневосточного и сибирского (урало-сибирского) [3–5].

Многолетний опыт организации мероприятий для защиты населения в природных очагах КЭ показал, что массовая плановая вакцинопрофилактика является наиболее активной мерой в снижении заболеваемости клещевым энцефалитом [6, 7].

Вакцины для профилактики КЭ производятся 5 предприятиями, два из которых находятся в России (ФГУП «НПО «Микроген» и ФГУП «Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова»), «Baxter AG вакцины» в Австрии, «Novartis-вакцины» в Германии, фирма «CIBP» в КНР [3]. Все указанные производи-

тели используют в производстве вакцин разные производственные штаммы вируса клещевого энцефалита.

Для производства вакцин КЭ (ЭнцеВир, ЭнцеВир Нео детский) в ФГУП «НПО «Микроген» применяется в течение многих лет штамм вируса КЭ № 205 (дальневосточный подтип (генотип) вируса КЭ, в качестве субстрата накопления вируса — первично-трипсинизированная взвешенная роллерная культура клеток фибробластов эмбрионов курицы (ФЭК)).

Штамм № 205 вируса КЭ был выделен в 1973 г. из клещей *Ixodes persulcatus* в зоне хвойно-широколиственных лесов Облученского района Хабаровского края. В 1975 г. штамм № 205 вируса КЭ был передан в Государственный институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича (ГИСК им. Л. А. Тарасевича), где были проведены исследования вирусного материала на соответствие биологическим и антигенным требованиям, предъявляемым к производственным штаммам вируса КЭ [1, 8, 9]. После аттестации лиофильно высушенный штамм № 205 был депонирован в Государственную коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР (номер депонента ГKB-553).

В 1978 г. штамм № 205 вируса КЭ был передан для производства вакцины КЭ в ФГУП «НПО «Микроген», филиал НПО «Вирин», г. Томск [1, 8]. На предприятии «Вирин» полученный лиофилизат вируса КЭ был обозначен как «эталонный штаммовый запас», разработана система ведения посевных серий штамма на этапах технологии производства вакцины. Информация об используемой при производстве вакцин КЭ системе получения посевных серий (при пассировании штамма № 205 на аутбредных белых мышях (масса тела 7–9 г)) представлена в таблице 1. Как видно из представленных в таблице 1 данных, при

производстве вакцины клещевого энцефалита штамм № 205 проходит от 4 до 6 пассажей через мозг аутбредных белых мышей и один пассаж на культуре клеток ФЭК. Пассирование штамма через мозг мыши и последующий пассаж на клетках ФЭК может привести к возможным изменениям в нуклеотидной последовательности вириона, что в свою очередь может привести к изменению биологических свойств вируса. Контроль генетической стабильности производственных штаммов вирусов рекомендован ICH Guidance, Q5D: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products (Гармонизированное трехстороннее руководство ICH (Качество биотехнологических средств: Испытание стабильности биотехнологических/биологических средств)) [10, 11]. Однако в отношении производственного штамма № 205 исследования генетической стабильности не проводились. Контроль посевных серий производственного штамма № 205 на соответствие регламентированным биологическим показателям проводился в ГИСК им. Л. А. Тарасевича до 2006 г.

Цель работы — анализ результатов многолетнего изучения биологической стабильности свойств производственного штамма вируса КЭ № 205 в сравнении с данными изучения современными методами молекулярной генетики образцов производственного штамма № 205 и, выборочно, одной из серий вакцины КЭ ЭнцеВир.

Материалы и методы

Определение генетической стабильности штамма проводили на образцах вируса, полученных на этапах производства вакцины на основе разных производственных «штаммовых запасов» вируса, а также на образцах готовой серии № T018 вакцины КЭ ЭнцеВир (табл. 1).

Таблица 1. Система посевных серий производственного штамма № 205 вируса КЭ, применяемая для изготовления серий культуральных инактивированных концентрированных очищенных вакцин КЭ на предприятии ФГУП «НПО «Микроген», филиал НПО «Вирин», г. Томск

Эталонный «штаммовый запас», 1978 г. (лиофилизат 1978 г.). Получен из ГИСК им. Л. А. Тарасевича	Производственный «штаммовый запас» (лиофилизат). II пассаж: даты изготовления: 1. 1986 г. (из лиофилизата 1978 г.), 2. 2003 г. (из лиофилизата 1986 г.)	Маточный «штаммовый запас»	Рабочий «штаммовый запас»	Суспензия посевного вируса	Культуральная вирус-содержащая жидкость для получения серии вакцины КЭ № T018
Количество пассажей производственной суспензии мозга мышей, инфицированных вирусом КЭ штамм № 205 (от эталонного «штаммового запаса»)	1–2 пассажа через мозг белой аутбредной мыши массой 7–8 г	1–2 пассажа производственного «штаммового запаса» через мозг белой аутбредной мыши массой 7–8 г	1 пассаж маточного «штаммового запаса» через мозг белой аутбредной мыши массой 7–8 г	1 пассаж рабочего штаммового запаса через мозг белой аутбредной мыши массой 7–8 г	Заражение ФЭК 10 % мышинной мозговой суспензией посевного вируса штамма № 205
Температура и срок хранения	Лиофилизат 1) 1978 г., минус 70 °С в течение 8 лет; Лиофилизат 2) 1986 г., минус 70 °С в течение 17 лет и 25 лет; Лиофилизат 3) 2003 г. (получен из лиофилизата 1986 г.), минус 70 °С в течение 12 лет и более	минус 70 °С не более 3 месяцев	минус 20 °С не более 14 сут	минус 20 °С не более 14 сут	Мозговая суспензия посевного вируса не хранится после контроля инфекционной активности, используется сразу для заражения ФЭК

I. Изучение биологической стабильности. При изучении биологической стабильности производственного штамма № 205 проводили ретроспективный анализ результатов изучения на производстве и в ГИСК им. Л. А. Тарасевича пассажей посевных серий штамма № 205 вируса КЭ через мозг аутобредных белых мышей, масса тела 7–8 г, по показателям нейровирулентности штамма с помощью стандартного метода титрования вируса при разных методах введения мышам — в мозг (в/м), подкожно (п/к) и внутривенно (в/в). Использовали: исходный материал — лиофилизат 10 % вирусодержащей суспензии мозга инфицированных мышей (эталонный штаммовый запас, лиофилизат 1978 г.). Определение титра вируса в $\lg LD_{50}/мл$ по результатам опытов титрования проводили по методу Рида и Менча [8, 9]. Регламентированные требования к биологической активности производственного штамма № 205 изложены в общей фармакопейной статье (ОФС) на вакцину КЭ: биологическая (инфекционная) активность производственного штамма № 205 по регламентированному лимиту нормативной документации: не менее $9,0 \lg LD_{50}/мл$, титрование вируса при в/м заражении мышей, масса тела 7–8 г, не менее $7,5 \lg LD_{50}/мл$ при п/к, не менее $8,5 \lg LD_{50}/мл$ при в/в заражении мышей той же весовой категории.

Подлинность штамма № 205 вируса КЭ — типоспецифичность в РБН (реакция биологической нейтрализации на мышах): индекс нейтрализации при внутримозговом методе постановки реакции биологической нейтрализации с гипериммунной вирусспецифической кроличьей сывороткой¹ к штамму № 205 — не менее 1000.

II. Изучение генетической стабильности. Для изучения генетической стабильности штамма № 205 были использованы образцы двух серий производственного «штаммового запаса», приготовленные в 1986 г. (на основе исходного эталонного штамма № 205 — лиофилизат 1978 г.), и 2003 г. (на основе лиофилизата производственного «штаммового запаса» от 1986 г.) и образцы готовой серии вакцины КЭ № Т018.

Выделение суммарной РНК. Выделение суммарной РНК из образцов вируса КЭ штамма № 205 (на разных стадиях системы производственного пассирования) и из образцов готовых серий вакцины проводили с использованием набора АмплиПрайм РИБО-сорб (производства ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотреб-

надзора, Россия). При выделении РНК из готовых серий вакцины предварительно проводили десорбцию антигена, как описано ранее [12]. Все работы по выделению РНК проводили согласно инструкции, прилагаемой к набору АмплиПрайм РИБО-сорб.

Проведение ОТ-ПЦР. При проведении ОТ-ПЦР в пробирку в соответствующем порядке вносили: 11 мкл раствора выделенной вирусной РНК, 4 мкл 5-кратного реакционного буфера (производства «СибЭнзим», Россия, кат. № В312), 2 мкл 10 мМ dNTP Mix («СибЭнзим», Россия, кат. № 025), 1 мкл праймера Random 9 (0,6 OD/ml) («СибЭнзим», Россия). Смесь нагревали в амплификаторе до температуры 70 °С в течение 3 мин, затем пробирку резко помещали в лед на 2 мин. После охлаждения смеси к ней добавляли 0,1 мкл фермента М — MuLV обратной транскриптазы («СибЭнзим», Россия, кат. № Е371). Отжиг и элонгацию производили при температуре 40 °С в течение 60 мин с последующей инактивацией фермента при температуре 70 °С в течение 10 мин. Выбор праймеров, позволяющих амплифицировать последовательности генов вируса клещевого энцефалита в виде перекрывающихся последовательностей, проводили с использованием программного обеспечения VectorNTI 10.0.

Амплификацию фрагментов генов вируса КЭ проводили в условиях, подобранных для каждой пары праймеров отдельно на приборе Терцик («ДНК-Технология», Россия).

Секвенирование проводили на приборе Prism 310 Genetic Analyzer с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США). Анализ данных секвенирования проводили с использованием программы Chromas 2.22 («Technelysium Pty Ltd», Австралия).

Результаты и обсуждение

I. Изучение биологической стабильности штамма № 205 при длительном хранении лиофилизатов вирусной суспензии и пассировании через мозг аутобредных белых мышей

Первый производственный лиофилизат вируса (производственный «штаммовый запас») был приготовлен в 1986 г. из ампулы исходного эталонного штамма № 205, полученного из ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Результаты оценки биологической активности и типоспецифичности первичного лиофилизата 1978 г. представлены в таблице 2. В таблице 3 указана биологическая активность нового

¹ Гипериммунная кроличья сыворотка получена методом иммунизации кроликов 10 % суспензией мозга инфицированных вирусом КЭ (штамм № 205 вируса КЭ) аутобредных мышей, масса тела 10–12 г. Сыворотка крови получена из НПО «Вирион», г. Томск.

Таблица 2. Инфекционная активность и подлинность штамма № 205 вируса КЭ после лиофилизации в 1978 г. (результаты первичной аттестации в ГИСК им. Л. А. Тарасевича до передачи на производство вакцины КЭ)

Штамм № 205 — лиофилизат 1978 г. (из ампулы)	Инфекционная активность при различных способах введения вируса аутобредным белым мышам			Индекс нейтрализации в РБН с гипериммунной кроличьей сывороткой к штамму № 205 (лимит: индекс нейтрализации не менее 1000)
Регламентируемые показатели ОФС на вакцину КЭ	в/м — не менее $9,0 \lg LD_{50}/мл$	п/к — не менее $7,5 \lg LD_{50}/мл$	в/в — не менее $8,0 \lg LD_{50}/мл$	Коэффициент индекса нейтрализации — не менее 1000
Титры вируса КЭ	$9,1 \lg LD_{50}/мл$	$8,4 \lg LD_{50}/мл$	$7,9 \lg LD_{50}/мл$	1259

Примечание. 1. в/м — внутримозговое заражение по 0,03 мл; п/к — подкожное заражение по 0,1 мл; в/в — внутривенное заражение по 0,25 мл.

2. Гипериммунная кроличья сыворотка получена методом иммунизации кроликов 10 % суспензией мозга инфицированных вирусом КЭ (штамм № 205 вируса КЭ) аутобредных мышей, масса тела 10–12 г. Сыворотка крови получена из НПО «Вирион», г. Томск.

Таблица 3. Анализ результатов изучения инфекционной активности и подлинности штамма № 205 после длительного хранения и пассивирования (производственный «штаммовый запас» — лиофилизат 1986 г.)

Дата титрования вируса и срок хранения лиофилизата 1986 г.	Заражение мышей в мозг (по 0,03 мл)	Заражение мышей подкожно (по 0,1 мл)	Заражение мышей внутрибрюшинно (по 0,25 мл)	Подлинность (индекс нейтрализации в РБН с эталонной сывороткой крови к вирусу КЭ)
Штамм № 205 вируса КЭ (лиофилизат 1986 г.)				
Регламентируемые показатели ОФС на вакцину КЭ	Титр вируса не менее 9,0 lg LD ₅₀ /мл	Титр вируса не менее 7,5 lg LD ₅₀ /мл	Титр вируса не менее 8,0 lg LD ₅₀ /мл	Не менее 1000
Февраль 1987 г. (через 1 год)	10,5	9,0	9,8	6310
Февраль 1989 г. (через 3 года)	9,0	н/и	н/и	79430
Февраль 1992 г. (через 6 лет)	10,0	8,6	8,7	1585
Июнь 1995 г. (через 9 лет)	11,0	10,0	10,0	3162
Штамм № 205 вируса КЭ (лиофилизат 2003 г., получен при пассивировании лиофилизата 1986 г.)				
Июль 2003 г. (после сушки)	9,0	7,6	7,9	63100
2005 г. (через 2 года)	10,0	9,3	9,9	125900
2006 г. (через 3 года)	10,0	9,6	9,2	38810

Примечание. Гипериммунная кроличья сыворотка получена методом иммунизации кроликов 10 % суспензией мозга инфицированных вирусом КЭ (штамм № 205 вируса КЭ) аутбредных мышей, масса тела 10–12 г. Сыворотка крови получена из НПО «Вирион», г. Томск.

производственного запаса, полученного в виде лиофилизата в 1986 г. и в 2003 г.

В таблице 3 представлены результаты изучения инфекционной активности и типоспецифичности лиофилизатов (1986 г. и 2003 г.) после длительного хранения при температуре минус 20 °С (до 17 лет — для лиофилизата 1986 г.). Биологическая активность лиофилизатов производственного «штаммового запаса» (1986 г. и 2003 г.) сохранялась при различных способах введения аутбредным белым мышам (масса тела 7–9 г) в соответствии с регламентированными лимитами нормативной документации: не менее 9,0 lg LD₅₀/мл при титровании вируса при заражении мышей в мозг (масса тела 7–8 г), не менее 7,5 lg LD₅₀/мл при подкожном заражении и не менее 8,5 lg LD₅₀/мл при внутрибрюшинном заражении мышей той же категории.

Как видно из данных, представленных в таблице 3, на различных сроках хранения установлены высокие показатели нейровирулентности: до 10,0–11,0 lg LD₅₀/мл, которые сохранялись для лиофилизатов производственного «штаммового запаса» при длительном хранении (от 3 до 9–17 лет — срок наблюдения).

Леофилизаты производственного «штаммового запаса» вируса КЭ штамм № 205 (1986 г. и 2003 г.) хранятся на производстве вакцин КЭ до настоящего времени и используются как исходный производственный штаммовый запас для последующего пассивирования через мозг мышей и заражения пассажным материалом культуры клеток ФЭК с целью получения культурального вируса КЭ — источника инактивированной культуральной вакцины КЭ (табл. 1). Лимит типоспецифичности штамма № 205 вируса КЭ должен быть (по нормативной документации на вакцину КЭ ЭнцеВир) в РБН с гипериммунной вирусспецифической антисывороткой к штамму № 205 не менее 1000. Как видно из результатов, представленных в таблицах 2 и 3, во всех случаях первичного изучения и длительного хранения лиофилизатов посевных серий штамма № 205 индексы нейтрализации всегда выше регламентированного показателя (1000). Таким образом, данные, представленные в таблице 3, свидетельствуют о выраженной биологической стабильности — сохранении регламентированных показателей инфекционной активности и типоспецифич-

ности производственного штамма № 205 вируса КЭ при длительном хранении и пассивировании.

II. Изучение генетической стабильности

Для изучения генетической стабильности были выбраны две области генома: 83-2619 и 3370-5393 н. (координаты по референсной последовательности ВКЭ NC 001672 из базы данных GenBank), представляющие особый интерес с иммунологической точки зрения.

Первая выбранная область генома 83-2619 н. кодирует капсидный белок С, предшественник матричного белка рМ и белок оболочки Е. Белок Е является основным иммуногеном вируса КЭ, в то время как белок рМ и его зрелая производная — белок М — обеспечивают правильность укладки белка Е на поверхности вириона. Изменения в структуре белка С могут существенно влиять на вирулентность вируса [13, 14]. Вторая область генома ВКЭ 3370-5393 н. кодирует неструктурные белки NS1 (частично), NS2a, NS2b и NS3. Гексамерная форма белка NS1 секретируется из клетки и ослабляет иммунный ответ хозяина [15]. Белок NS2a также участвует в подавлении иммунного ответа путем ингибирования продукции интерферона и, кроме того, необходим для правильной сборки вирусных частиц [16]. Белки NS2b и NS3 формируют ферментативный комплекс, обладающий протеазной и хеликазной активностями и влияющий на вирулентные свойства вируса. Этот комплекс представляет собой одну из наиболее перспективных мишеней для разработки лекарственных антивирусных препаратов, направленных на ингибирование вирусных ферментов [17, 18].

Для секвенирования генов С, М, Е, NS2A, NS2B (области в геноме 83-2619 и 3370-5393 н.) вируса КЭ были выбраны, синтезированы и использованы следующие праймеры (цифры отображают позиции в геноме):

Праймеры для амплификации и секвенирования гена белка С

81E 5' GCT GCC GTG GCC TGT TTCA 3'	(19)
334E 5' CAG TCG TGA ACG TGT TGA GAA AAA GAC 3'	(27)
236E 5' TGG ACT CGT GTT GAT GCG CAT GA 3'	(23)
1038 5' GAG TCA CGC GAG TGG TTC CCT GA 3'	(23)

Праймеры для амплификации и секвенирования гена белка М

816E 5' TCA CTG CGG ACG CAC CTC ACT AG 3'	(25)
1412 5' CGT ATG CGG CTC TAC TTT GAC TGT A 3'	(27)
236E 5' TGG ACT CGT GTT GAT GCG CAT GA 3'	(23)
1038 5' GAG TCA CGC GAG TGG TTC CCT GA 3'	(23)
816E 5' TCA CTG CGG ACG CAC CTC ACT AG 3'	(29)
936E 5' CCA GGC ACA AGA GCA CCA CCA C 3'	(28)

Праймеры для амплификации и секвенирования гена белка NS2a

3689E 5' CTA TGT CGT GGC AGT TGG GAT CAC A 3'	(25)
4577 5' TTC TGA CAG CGT CCA CAA TCC CAT C 3'	(25)
3365E 5' CAC AGA GAG TGG CAA GGT GAT CCC 3'	(24)
3925E 5' GCT CTG AAA ATC AAT GCC CCC A 3'	(22)
3807E 5' CGC AGC AAC CTC ACC GTC AGA 3'	(21)

Праймеры для амплификации и секвенирования гена белка NS2b

3689E 5' CTA TGT CGT GGC AGT TGG GAT CAC A 3'	(25)
4577 5' TTC TGA CAG CGT CCA CAA TCC CAT C 3'	(25)
4343E 5' GAC CTG CAC TGT CTC ACC TTT CCA 3'	(26)
4872E 5' GAC CTG CAC TGT CTC ACC TTT CCA 3'	(24)
4300E 5' CCG TGG CTT CGT TCC TTC TGC TTA 3'	(24)
4408E 5' ACC CGC AGG CTC ACC TCT CCA C 3'	(22)

Праймеры для амплификации и секвенирования гена белка Е

816 5' TCA CTG CGG ACG CAC CTC ACT AG 3'	(23)
1412 5' CGT ATG CGG CTC TAC TTT GAC TGT A 3'	(25)
1220 5' TGA AGA GCA CCA GAG TGG CAC A 3'	(22)
1692 5' GCC GTT CCG CAT TGT TCC A 3'	(19)
1595 5' CCT ACC GAC GGC CTG GCA GGT 3'	(21)
2064 5' CGA TTG TGG GGT TGG GTG TTA TCA A 3'	(25)
1955 5' GGA GGT TGC GTT CTC TGG GAC CAA 3'	(24)
2656 5' GCC ATT TCG AGT CTG TTT TGG GGC A 3'	(25)

При компьютерном анализе последовательности сконструированных олигонуклеотидов не образовывали стабильных вторичных структур в виде шпилек (в них отсутствовали протяженные палиндромные последовательности) и термодинамически стабильные гомо- и гетеро- (с соответствующим парным олигонуклеотидом) димеры [4].

Нами была определена первичная структура двух производственных «штаммовых запасов» штамма № 205 (1986 г. и 2003 г.) по областям генома 83-2619 и 3370-5393 н. (срок хранения лиофилизатов при температуре минус 20 °С от 4 до 13 лет и более). При сравнении первичных последовательностей секвенированных областей было показано полное отсутствие нуклеотидных замен и их полная идентичность между собой. Последовательности изученных генов выложены в GenBank: для генов белков NS1, NS2a, NS2b, NS3 — KC415176 (материал 2003 г.), для генов белков С, preM, М, Е — JX987280 (материал 2003 г.).

На следующем этапе работ нами было проведено сравнение первичных последовательностей указанных областей генома вируса КЭ для маточного штамма, полученного из производственного «штаммового запаса» 2003 г., а также для маточного штамма, полученного из производственного «штаммового запаса» 1986 г. При проведении сравнительного анализа первичных последовательностей областей генома вируса КЭ (позиции в геноме

83-2619 и 3370-5393 н.) была также показана их полная идентичность последовательностям производственных «штаммовых запасов» (2003 г. и 1986 г.). Изучение нуклеотидных последовательностей материала рабочего «штаммового запаса», суспензии посевного вируса, использованных для производства серии № T018 вакцины КЭ Энцевир, также подтвердило их идентичность с производственным «штаммовым запасом» 2003 г. (KC415176, JX987280).

Таким образом, в течение 4 последовательных в/м пассажей в процессе производства вакцины КЭ на основе штамма № 205 вируса КЭ не происходит нуклеотидных замен в изучаемых генах.

При выделении РНК из готовых серий вакцины предельно проводили десорбцию антигена, как это описано ранее [12].

Определение первичной структуры исследуемых областей генома вируса КЭ в готовой серии № T018 вакцины КЭ Энцевир, приготовленной в 2013 г., также показало полную гомологию с генетической структурой производственного «штаммового запаса» штамма № 205 (лиофилизат 2003 г.).

Выводы

1. Анализ результатов аттестации биологических свойств (в опытах титрования нейровирулентности и подлинности штамма № 205 в РБН) лиофилизатов производственного «штаммового запаса» (лиофилизаты 1986 г. и 2003 г.) штамма № 205 вируса КЭ на разных сроках длительного хранения и пассирования через мозг аутбредных белых мышей и заражения культуры клеток ФЭК подтверждает биологическую стабильность производственного штамма № 205 вируса КЭ в соответствии с регламентированными требованиями нормативной документации на вакцину КЭ. Показатели нейровирулентности при различных способах введения вируса КЭ мышам и типоспецифичности в РБН стабильны при условии выполнения разработанной системы ведения посевных серий вируса КЭ при производстве вакцин КЭ Энцевир, Энцевир Нео детский на предприятии ФГУП «НПО «Микроген», филиал НПО «Вирион», г. Томск.

2. С помощью молекулярно-генетических методов (выделение РНК, ОТ-ПЦР, секвенирование) подтверждена стабильность генетической структуры производственного вакцинного штамма № 205 вируса КЭ, применяемого для получения вакцины КЭ Энцевир, на длительных сроках хранения и пассирования. Определена первичная структура двух производственных «штаммовых запасов» (лиофилизаты 1986 г. и 2003 г.). При сравнении первичных последовательностей секвенированных областей было показано полное отсутствие нуклеотидных замен и их полная идентичность между собой.

Последовательности изученных генов выложены в GenBank.

3. Впервые проведено молекулярно-генетическое исследование образцов серии № T018 готовой формы вакцины КЭ из штамма № 205 с применением десорбции вакцинного антигена с сорбента — алюминия гидроксида. Получены идентичные результаты при исследовании генетической стабильности штаммового материала после пассажа в культуре клеток ФЭК [12].

Литература

1. Воробьева МС, Меркулов ВА, Ладыженская ИП, Рукавишников АВ, Шевцов ВА. История создания и оценки качества современных вакцин КЭ отечественного и зарубежного производства. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения* 2013; (3): 40–4.
2. Barrett PN, Plotkin SA, Ehrlich HJ. Tick-borne encephalitis virus vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, eds. *Vaccines*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008. P. 841–56.
3. Морозова ОВ. Проблемы и перспективы профилактики, диагностики и лечения клещевого энцефалита. *Российский медицинский журнал* 2014; 20(6): 26–31.
4. Pastorino BA, Peyrefitte CN, Grandadam M, Thill MC, Tolou HJ, Bessaud M. Mutagenesis analysis of the NS2B determinants of the Alkhurma virus NS2B-NS3 protease activation. *J Gen Virol*. 2006; 87: 3279–83.
5. Pöllbauer EM, Pavlova BG, Löw-Baselli A, Fritsch S, Prymula R, Angermayr R, et al. Comparison of immunogenicity and safety between two paediatric TBE vaccines. *Vaccine* 2010; 28(29): 4680–5.
6. Горбунов МА, Павлова ЛИ, Воробьева МС, Расцепкина МН, Стронин ОВ. Результаты клинических испытаний вакцины против клещевого энцефалита Энцевир. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика* 2002; (1): 64–8.
7. Романенко ВВ, Анкудинова АВ, Киячина АС. Эффективность программы массовой вакцинопрофилактики клещевого энцефалита в Свердловской области. *Вестник УГМА* 2010; (21): 125–32.
8. Воробьева МС, Расцепкина МН, Красильников ИВ, Мищенко ИА, Шарова ОИ, Рюмина ТА, Билалова ГП. Результаты лабораторных испытаний модифицированной вакцины против клещевого энцефалита «Энцевир», производства ФГУП «ВИРИОН». В кн.: *Актуальные вопросы разработки, производства и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов. Тезисы конференции, 2001*. С. 8–11.
9. Котыков ИВ, Киселева НН, Федоров ЮВ. Изучение популяции производственного штамма 205 вируса клещевого энцефалита. В кн.: *Тезисы докладов Всесоюзного симпозиума «Современные проблемы эпидемиологии, диагностики и профилактики клещевого энцефалита»*, 1990. С. 71–2.
10. Holzmann H, Vorobyova MS, Ladyzhenskaya IP, Forenczi E, Kundu M, Kunz C, Heinz FX. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes. *Vaccine* 1992; 10(5): 345–9.
11. ICH Guidance, Q5D: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products (63 FR 50244; September 21, 1998).
12. Андреев ЮЛ, Маева ТВ, Кедич ЛА, Золина ЕД, Куслий АГ. Физико-химическая и иммунологическая характеристика вакцины «Геп-а-ин-вак» при различных условиях хранения. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2008; (4): 26–8.
13. Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol*. 1999; 80(1): 179–85.
14. ICH Guidance, Q5A(R1): Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin (63 FR 51074; September 24, 1998).
15. Akey DL, Brown WC, Dutta S, Konwerski J, Jose J, Jurkiw TJ, et al. Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. *Science* 2014; 343(6173): 881–5.
16. Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh AA. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J Virol*. 2008; 82(10): 4731–41.
17. Kofler RM, Heinz FX, Mandl CW. Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence. *J Virol*. 2002; 76(7): 3534–43.
18. Mandl CW, Heinz FX, Stockl E, Kunz C. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. *Virology* 1989; 173(1): 291–301.
19. Zent O, Bröker M. Tick-borne encephalitis vaccines: past and present. *Expert Rev Vaccines* 2005; 4(5): 747–55.

Об авторах

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

Воробьева Мая Сергеевна. Главный эксперт управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Щербинина Мария Сергеевна. Эксперт 2-й категории лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Саркисян Каринэ Арташесовна. Начальник лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Шевцов Владимир Александрович. Начальник управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. мед. наук.

Рукавишников Андрей Владимирович. Заместитель начальника управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. биол. наук.

Бондарев Владимир Петрович. Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Федеральное государственное унитарное предприятие «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России, 198320, Российская Федерация, Санкт-Петербург, г. Красное Село, ул. Свободы, д. 52.

Игнатьев Георгий Михайлович. Заместитель директора, д-р мед. наук, профессор.

Научно-производственное объединение «СибЭнзим», 630117, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Академика Тимакова, д. 2/12. Нетесова Нина Александровна. Заместитель директора, д-р биол. наук.

Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127473, Российская Федерация, Москва, 2-й Волконский переулок, д. 10.

Отрашевская Елена Викторовна. Начальник отдела НИОКР.

Филиал федерального государственного унитарного предприятия «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации в г. Томске «НПО «Вирион», 634040, Российская Федерация, г. Томск, ул. Ивановского, д. 8.

Ставицкая Нина Христиановна. Консультант, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Воробьева Мая Сергеевна; gisk lab@mail.ru;
Щербинина Мария Сергеевна; Shcherbinina@exrmed.ru

Analysis of biological and genetic stability of tick-borne encephalitis strain 205 used in the production of tick-borne encephalitis vaccines EnceVir and EnceVir Neo for children

M. S. Vorobyeva¹, G. M. Ignatyev², N. A. Netesova³, E. V. Otrachevskaya⁴, N. Kh. Stavitskaya⁵,
M. S. Shcherbinina¹, K. A. Sarkisyan¹, V. A. Shevtsov¹, A. V. Rukavishnikov¹, V. P. Bondarev¹

¹ 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

² Federal State Unitary Enterprise «Saint-Petersburg Research Institute of Vaccines and Sera & Enterprise for Production of Bacterial Products» of the Federal Medico-Biological Agency of Russia, Svobody st. 52, Krasnoe Selo, Saint-Petersburg 198320, Russian Federation

³ Scientific-Production Association SibEnzyme Ltd., Akademika Timakova st. 2/12, Novosibirsk 630117, Russian Federation

⁴ Federal State Unitary Enterprise «Scientific-Production Association «Microgen» of the Ministry of Health of Russia, 2nd Volkonsky lane 10, Moscow 127473, Russian Federation

⁵ «Virion» Tomsk Branch of the Federal State Unitary Enterprise «Scientific-Production Association «Microgen» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ivanovskogo st. 8, Tomsk 634040, Russian Federation

The article presents the results of a long-term study of biological and genetic stability of tick-borne encephalitis strain 205 which is used by the FSUE «SPA «Microgen» to produce tick-borne encephalitis vaccines EnceVir (for adults) and EnceVir Neo for children, both of which are tissue cultured, inactivated, purified, and sorbed. The biological stability of strain 205 was studied at the seed lot stage using passages on outbred white mice: initial production strain 205 and production «stock strain». Lyophilisates of production seed lots were studied at different storage intervals at –20 °C (up to 9 years of storage and more). Biological activity parameters (tick-borne encephalitis virus (TBEV) titre in log LD₅₀/ml) were studied by using different ways of infecting outbred white mice, and strain 205 identification (specificity) was determined by comparing it to a reference strain in a biological neutralization assay (BNA) according to the manufacturer's specifications for the vaccines concerned. The same materials and a batch of TBEV vaccine produced from the production «stock strain» (lyophilisate of 1986) were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing for genetic stability during passaging and long-term storage. The results of the study made it possible to demonstrate the biological and genetic stability of strain 205 during production of TBEV vaccines.

Key words: tick-borne encephalitis; vaccination; production of tick-borne encephalitis vaccines; biological and genetic stability; identification in a biological neutralization assay; outbred white mouse brain passage; polymerase chain reaction; primers; sequencing.

For citation: Vorobyeva MS, Ignatyev GM, Netesova NA, Otrachevskaya EV, Stavitskaya NK, Shcherbinina MS, Sarkisyan KA, Shevtsov VA, Rukavishnikov AV, Bondarev VP. Analysis of biological and genetic stability of tick-borne encephalitis strain 205 used in the production of tick-borne encephalitis vaccines EnceVir and EnceVir Neo for children. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(2): 95–102.

References

1. Vorobieva MS, Merkulov VA, Ladyzhenskaya IP, Rukavishnikov AV, Shevtsov VA. The history and quality evaluation of tick-borne encephalitis vaccine. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* 2013; (3): 40–4 (in Russian).
2. Barrett PN, Plotkin SA, Ehrlich HJ. Tick-borne encephalitis virus vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, eds. *Vaccines*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008. P. 841–56.
3. Morozova OV. Problems and prospects of prevention, diagnosis and treatment of tick-borne encephalitis. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal* 2014; 20(6): 26–31 (in Russian).
4. Pastorino BA, Peyrefitte CN, Grandadam M, Thill MC, Tolou HJ, Bessaud M. Mutagenesis analysis of the NS2B determinants of the Alkhurma virus NS2B-NS3 protease activation. *J Gen Virol*. 2006; 87: 3279–83.
5. Pöllabauer EM, Pavlova BG, Löw-Baselli A, Fritsch S, Prymula R, Angermayr R, et al. Comparison of immunogenicity and safety between two paediatric TBE vaccines. *Vaccine* 2010; 28(29): 4680–5.
6. Gorbunov MA, Pavlova LI, Vorobieva MS, Raschepkina MN, Stornin OB. Results of clinical trials of a vaccine against tick-borne encephalitis EnceVir. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika* 2002; (1): 64–8 (in Russian).
7. Romanenko VV, Ankudinova AV, Kilyachina AS. The effectiveness of the program of mass vaccination encephalitis in the Sverdlovsk Region. *Vestnik UGMA* 2010; (21): 125–32 (in Russian).
8. Vorobieva MS, Raschepkina MN, Krasilnikov IV, Mischenko IA, Sharov OI, Ryumin TA, Bilalova GP. The results of laboratory tests of the modified vaccine «EnceVir» against tick-borne encephalitis, produced by FSUE «VIRION». In: *Topical issues of development, production and use of immunobiological and pharmaceutical preparations. Abstracts of Conference*, 2001. P. 8–11 (in Russian).
9. Kotykov IV, Kiseleva NN, Fedorov YuV. Study of the population of production strain 205 of the virus of tick-borne encephalitis. In: *Abstracts of the All-Union Symposium «Modern epidemiology problems, diagnosis and prevention of tick-borne encephalitis»*, 1990. P. 71–2 (in Russian).
10. Holzmänn H, Vorobyova MS, Ladyzhenskaya IP, Forenczi E, Kundli M, Kunz C, Heinz FX. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes. *Vaccine* 1992; 10(5): 345–9.
11. ICH Guidance, Q5D: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products (63 FR 50244; September 21, 1998).
12. Andreev YuL, Maeva TV, Kedich LA, Zolina ED, Kusliy AG. Physico-chemical and immunological characteristics of the vaccine «Hep-in-a-vak» at different storage conditions. *Biopreparation. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2008; (4): 26–8 (in Russian).
13. Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol*. 1999; 80(1): 179–85.

14. ICH Guidance, Q5A(R1): *Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin* (63 FR 51074; September 24, 1998).
15. Akey DL, Brown WC, Dutta S, Konwerski J, Jose J, Jurkiw TJ, et al. *Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. Science* 2014; 343(6173): 881–5.
16. Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh AA. *Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. J Virol.* 2008; 82(10): 4731–41.
17. Kofler RM, Heinz FX, Mandl CW. *Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence. J Virol.* 2002; 76(7): 3534–43.
18. Mandl CW, Heinz FX, Stockl E, Kunz C. *Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. Virology* 1989; 173(1): 291–301.
19. Zent O, Bröker M. *Tick-borne encephalitis vaccines: past and present. Expert Rev Vaccines.* 2005; 4(5): 747–55.

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.

Vorobyeva MS. Chief expert of the Division for Evaluation of Antiviral Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences, professor.

Scherbinina MS. 2nd professional category expert of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Sarkisyan KA. Head of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Shevtsov VA. Head of the Division for Evaluation of Antiviral Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Candidate of Medical Sciences.

Rukavishnikov AV. Deputy head of the Division for Evaluation of Antiviral Medicinal Immunobiological Products of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Candidate of Biological Sciences.

Bondarev VP. Director of the Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products. Doctor of Medical Sciences, professor.

Federal State Unitary Enterprise «Saint-Petersburg Research Institute of Vaccines and Sera & Enterprise for Production of Bacterial Products» of the Federal Medico-Biological Agency of Russia, Svobody st. 52, Krasnoe Selo, Saint-Petersburg 198320, Russian Federation.

Ignatyev GM. Deputy director. Doctor of Medical Sciences, professor.

Scientific-Production Association SibEnzyme Ltd., Akademika Timakova st. 2/12, Novosibirsk 630117, Russian Federation.

Netesova NA. Deputy director. Doctor of Biological Sciences.

Federal State Unitary Enterprise «Scientific-Production Association for Medicinal Immunobiological Products «Microgen» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2nd Volkonsky lane 10, Moscow 127473, Russian Federation.

Otrashevskaya EV. Head of the R&D Department.

«Virion» Tomsk Branch of the Federal State Unitary Enterprise «Scientific-Production Association for Medicinal Immunobiological Products «Microgen» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ivanovskogo st. 8, Tomsk 634040, Russian Federation.

Stavitskaya NKh. Consultant. Doctor of Medical Sciences, professor.

Разработка подходов к проведению испытания гетерологичных сывороточных препаратов по показателю «Стерильность» методом мембранной фильтрации

С. М. Суханова, З. Е. Бердникова

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

Поступила 06.03.2017 г. Принята к публикации 14.04.2017 г.

Достоверная оценка качества препаратов крови по показателю «Стерильность» в аспекте микробиологической безопасности занимает особое положение и относится к наиболее сложному и ответственному контролю. Метод мембранной фильтрации с использованием замкнутой системы многие годы является основным и предпочтительным для испытания стерильности фактически всех известных лекарственных средств. Однако испытание стерильности отечественных гетерологичных сывороточных препаратов производители осуществляют только методом прямого посева. Проведенное исследование, выполненное с целью определения возможности использования метода мембранной фильтрации при испытании гетерологичных сывороточных препаратов по показателю «Стерильность», позволило модифицировать пробоподготовку предварительным разведением образцов в среднем в 1,5–2 раза стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида с последующей фильтрацией с увеличенной скоростью, что обеспечивает снижение сорбции белков мембранным фильтром. Определен диапазон белковой нагрузки на мембрану при испытании сывороточных препаратов в соответствии с требованиями ГФ XIII. Показана возможность использования различных типов фильтроэлементов из смешанных эфиров целлюлозы и Durapore® (PVDF) для проведения испытания методом мембранной фильтрации сывороточных препаратов с белковой нагрузкой до 12 г белка на мембрану. Подтверждена сопоставимость результатов испытаний стерильности гетерологичных сывороточных препаратов методом прямого посева и мембранной фильтрации. Адаптированная к белоксодержащим препаратам методика позволяет использовать для проведения испытания по показателю «Стерильность» более надежный и современный метод мембранной фильтрации и может быть рекомендована для включения в нормативные документы на соответствующие препараты наряду с используемым в настоящее время методом прямого посева.

Ключевые слова: микробиологическая безопасность; лекарственные средства; гетерологичные сывороточные препараты; стерильность; мембранная фильтрация; оценка качества.

Библиографическое описание: Суханова СМ, Бердникова ЗЕ. Разработка подходов к проведению испытания гетерологичных сывороточных препаратов по показателю «Стерильность» методом мембранной фильтрации. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(2): 103–109.

В современной системе оценки качества лекарственных препаратов крови человека и гетерологичных сывороточных препаратов показатели биологической безопасности, в том числе испытание на стерильность занимают особое место и относятся к наиболее сложному и ответственному контролю. Это обусловлено как особенностью их производства (использованием в качестве сырья биологического материала, стерилизацией конечного продукта фильтрованием), так и свойствами самих препаратов, содержащими белковые компоненты и являющимися благоприятной средой для роста и размножения микроорганизмов-контаминантов. Важнейшим условием обеспечения микробиологической безопасности лекарственных средств (ЛС) является использование при оценке качества точных, высокочувствительных методов, позволяющих получать достоверные, воспроизводимые результаты по выявлению микроорганизмов в исследуемых образцах. При оценке микробиологической безопасности применения ЛС и экспертизе отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения лекарственного препарата одним из наиболее значимых показателей оценки качества препаратов крови является достоверность результатов испытания на стерильность. В соответствии с требованиями ведущих фармакопей мира испытание на стерильность

ЛС может быть проведено методом прямого посева или методом мембранной фильтрации [1–6]. Использование каждого из указанных методов имеет свои преимущества и недостатки.

Метод прямого посева является более простым, экономичным, с небольшим количеством операций при посеве, при этом объем образца для испытания ограничен, возникает необходимость решения вопроса о наличии и способах устранения антимикробного действия препарата, подавляющего рост контаминантов, а также пересева препаратов, вызывающих помутнение питательной среды, что, в том числе, повышает риск получения ложноположительных результатов (до 15 %). Метод мембранной фильтрации лишен этих недостатков, однако не позволяет испытывать некоторые вещества (так называемые нефилтруемые образцы), закупоривающие мембрану. Выпускаемые для мембранной фильтрации фильтры из эфира нитрата целлюлозы в основном предназначены для водных, масляных и слабых спиртовых растворов, фильтры из эфира ацетата целлюлозы — для концентрированных спиртовых растворов и кислот, а фильтры Durapore® (PVDF) — для антибиотиков. Известно, что препараты крови, в том числе сыворотки, относятся к трудно фильтруемым препаратам [7, 8]. Гетерологичные сыворотки пред-

ставляют собой иммуноглобулиновую фракцию сывороток крови животных и являются сложными белоксодержащими препаратами (8–14 %) [7, 9–14]. Высокая молекулярная масса белков обуславливает их неспособность проходить через полупроницаемые искусственные мембраны (целлофан, пергамент, коллодий), а также биомембраны растительных и животных тканей. Характерными свойствами растворов таких белков являются: низкое осмотическое давление, высокая вязкость, гидрофобность (растворимы в разбавленных растворах нейтральных солей, кислот и щелочей), способность к набуханию в очень больших пределах, а также незначительная способность к диффузии [7]. Наличие этих свойств у сывороточных препаратов, безусловно, может затруднить процесс их фильтрации и отмывки мембраны и быть препятствием для проведения испытания методом мембранной фильтрации. Очевидно, по этим причинам производители не рекомендуют конкретные фильтроэлементы для таких белковых препаратов.

ОФС 1.2.4.003.15 «Стерильность» ГФ XIII, а также фармакопеями других стран рекомендовано использовать метод мембранной фильтрации во всех случаях, когда состав препарата, его физико-химические свойства и природа позволяют фильтровать его через мембранные фильтры, а метод прямого посева — для препаратов, испытание которых невозможно выполнить методом мембранной фильтрации [1–6]. Метод мембранной фильтрации многие десятилетия используется при испытании различных препаратов ведущими фармацевтическими предприятиями и контрольными лабораториями во многих странах.

Использование данного метода, наряду с методом прямого посева, предусмотрено фармакопейными статьями ГФ XIII, в том числе, и для гетерологичных сывороток [9–14, 15], однако до настоящего времени согласно действующим нормативным документам (НД) испытание всех зарегистрированных отечественных гетерологичных сывороточных препаратов проводят только методом прямого посева [16–23]. Методика испытания стерильности белковых препаратов с детальным описанием процедуры отсутствует.

Более того, приказом Минздрава России от 28 октября 2015 г. № 770 установлено, что нормативная документация на зарегистрированные лекарственные препараты для медицинского применения, а также на лекарственные препараты для медицинского применения, заявленные о государственной регистрации которых представлены в Министерстве здравоохранения Российской Федерации до введения в действие общих фармакопейных статей, утвержденных настоящим приказом, подлежит приведению в соответствие с данными общими фармакопейными статьями до 1 января 2019 года [24].

Цель работы — разработка подходов и определение возможности проведения испытания гетерологичных сывороточных препаратов по показателю «Стерильность» методом мембранной фильтрации.

Задачи исследования:

1. Определение возможности проведения испытания отечественных гетерологичных сывороток методом мембранной фильтрации с использованием закрытой системы.
2. Оценка результатов испытания стерильности сывороточных препаратов с использованием различных типов фильтроэлементов: нитрата или ацетата целлюлозы и Durapore® (PVDF) из поливинилиденфторида.
3. Оптимизация методики испытания для снижения риска получения недостоверных результатов.

4. Анализ результатов испытаний стерильности гетерологичных сывороток методом прямого посева и мембранной фильтрации.

5. Оценка применимости разработанной методики для различных гетерологичных сывороточных препаратов.

Материалы и методы

Материалы

Объектами настоящего исследования были образцы зарегистрированных в Российской Федерации препаратов гетерологичных сывороток:

- Сыворотка противостолбнячная лошадиная очищенная концентрированная, раствор для инъекций, ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия;
- Сыворотка противодифтерийная лошадиная очищенная концентрированная, раствор для инъекций, ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия;
- Сыворотки противоботулинические типов А, В и Е лошадиные очищенные концентрированные, раствор для инъекций, ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия;
- Сыворотка противогангренозная поливалентная лошадиная очищенная концентрированная, раствор для инъекций, ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия;
- Сыворотка против яда гадюки лошадиная очищенная концентрированная, раствор для инъекций, ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия;
- Сыворотка лошадиная очищенная, разведенная 1:100, раствор для внутрикожного введения, ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия.

Методы

Испытания по показателю «Стерильность» проводили в асептических условиях, исключающих контаминацию испытуемых образцов, в боксе биологической безопасности II класса:

- методом мембранной фильтрации в соответствии с ГФ XIII, ОФС 1.2.4.003.15 с использованием прибора Стеритест Компакт («Merck-Millipore») закрытого типа и фильтроэлементов: TZHA LA2 10, TLHALV2 10 (смешанные эфиры (нитрат-, ацетат-) целлюлозы), TZHV AB2 10 (Durapore®) (PVDF) (поливинилиденфторид) с применением основных стадий: смачивание мембран, подготовка образцов, фильтрация содержимого всех емкостей через мембранные фильтры, промывка мембранных фильтров соответствующим стерильным раствором, добавление питательной среды и инкубирование посевов;
- методом прямого посева в соответствии с требованиями, изложенными в нормативной документации на препараты [16–23].

Для правильной постановки испытания учитывали данные об отсутствии антимикробного действия препаратов.

Количество контролируемых емкостей на каждый температурный режим определяли с учетом общего количества емкостей в серии, а также объема первичной упаковки препарата в соответствии с требованиями ГФ XIII, ОФС 1.2.4.003.15 «Стерильность» [1].

Посевы инкубировали 14 сут при температуре (32,5±2,5) °С и при температуре (22,5±2,5) °С в жидкой тигмогликолевой и соево-казеиновой средах соответственно, независимо от метода посева. Определение ростовых свойств питательных сред проводили в соответствии с требованиями ГФ XIII, ОФС 1.2.4.003.15 «Стерильность» [1, 25].

В ходе исследования испытано более 70 серий 8 наименований зарегистрированных в Российской Федерации отечественных гетерологических сывороточных препаратов.

Результаты и обсуждение

В работе изучены свойства наиболее универсальных мембранных фильтров, выпускаемых для оценки качества методом мембранной фильтрации различных по свойствам лекарственных средств. Широко используемые во всем мире для этих целей фильтры из смеси эфиров ацетата и нитрата целлюлозы, по данным авторов соединяющие в себе свойства двух типов мембран, гидрофильны, имеют небольшую экстрагируемость (<1,0 %), низкий коэффициент связывания белка и высокую пористость, обеспечивающую высокую скорость потока [26]. Мембранные фильтры Durapore® из поливинилиденфторида имеют сходные характеристики, сохраняя свои гидрофильные свойства, но обладают меньшей экстрагируемостью (<0,5 %), более широкой химической совместимостью и низкой связываемостью белков. Так, например, фильтры MF-Millipore из смеси ацетата и нитрата целлюлозы — TZHA LA2 10, TLHALV2 10, впаянные в канистры, сорбируют до 150 мкг/см² белка, фильтры Durapore® (PVDF) с гидрофобным краем сорбируют значительно меньше белка — до 4 мкг/см² [26].

Проведен расчет максимально возможных белковых нагрузок гетерологических сывороток на мембрану фильтра при испытании образцов в количестве (в зависимости от объема серии) в соответствии с требованиями ГФ XIII ОФС 1.2.4.003.15 «Стерильность» [1]. При посеве пяти–десяти образцов (расфасованных по 1,0–17,4 мл) с концентрацией белка согласно НД от 0,08 до 14 % максимальная нагрузка для большинства препаратов составит от 2 до 12 г.

Расчет проводили по формуле: $M_{г\max} = (C \cdot n \cdot V)/100$, где C — концентрация белка, %; n — количество образцов; V — объем препарата в первичной упаковке, мл.

В таблице 1 представлены данные по максимальному содержанию белка в испытуемой пробе при контроле стерильности гетерологических сывороток 8 наименований, с учетом количества образцов, требуемых для испытания.

Испытание сывороток было проведено с использованием различных фильтроэлементов: с мембранами из смешанных эфиров целлюлозы и мембраной Durapore®.

Процедуру смачивания и промывки мембранных фильтров проводили с одинаковой скоростью 0,9 % раствором натрия хлорида. Для снижения сорбции белков все содержимое каждой из 5–10 емкостей с испытуемым препаратом без пробоподготовки пропускали через мембраны канистр двух типов, увеличив скорость фильтрации в 1,5–2 раза. В связи с тем, что исследуемые препараты не обладали антимикробным действием, дополнительную отмывку не проводили. Добавление питательных сред (тиогликолевая и соево-казеиновая) по 100 мл в каждую канистру проводили со скоростью, применяемой при процедуре смачивания фильтров. Инкубирование посевов, учет и интерпретацию результатов проводили в соответствии с требованиями ГФ XIII, ОФС 1.2.4.003.15 «Стерильность».

Проведенные по данной схеме испытания отечественных гетерологических сывороточных препаратов показали возможность проведения контроля стерильности методом мембранной фильтрации с использованием закрытой системы. Основные стадии методики: смачивание мембран, фильтрация испытуемых образцов всех восьми типов гетерологических сывороток с белковой нагрузкой в среднем от 2 до 12 г на мембрану и промывка мембранных фильтров по 100 мл 0,9 % стерильным раствором натрия хлорида с последующим добавлением питательной среды были успешно проведены. Образцы препаратов проходили че-

Таблица 1. Белковая нагрузка на мембрану при испытании стерильности гетерологических сывороток методом мембранной фильтрации в соответствии с требованиями ГФ XIII ОФС 1.2.4.003.15 «Стерильность»

№ п/п	Наименование препарата	Белок, % по НД, С	Максимальное количество образцов, n	Объем препарата/объем на мембрану, V, мл	Белковая нагрузка, $M_{г\max}$
1	Сыворотка противостолбнячная лошадиная очищенная концентрированная жидкая (сыворотка противостолбнячная) раствор для внутримышечного и подкожного введения 3000, 10000, 20000, 50000 ME	8–12	10	3/30	2,4–3,6
2	Сыворотка противоботулиническая типа А лошадиная очищенная концентрированная жидкая, 10000 ME/мл	8–12	10	5/50; 10/100	4 – 12
3	Сыворотка противоботулиническая типа В лошадиная очищенная концентрированная жидкая, 5000 ME/мл	8–13	10	5/50; 8,5/85	4–11,2
4	Сыворотка противоботулиническая типа Е лошадиная очищенная концентрированная жидкая 10000 ME/мл	8–12	10	5/50; 10/100	4–12
5	Сыворотка противогангренозная поливалентная лошадиная очищенная концентрированная. Антитоксин гангренозный раствор для инъекций 30000 ME/доза	8–14	5	17,4/87	7–12
6	Сыворотка противодифтерийная лошадиная очищенная концентрированная. Антитоксин дифтерийный раствор для внутримышечного и подкожного введения 10000 ME	8–12	10	5/50; 10/100	4–12
7	Сыворотка лошадиная очищенная, разведенная 1:100, раствор для внутривенного введения	0,08–0,13	10	1/10	0,008–0,013
8	Сыворотка против яда гадюки обыкновенной лошадиная очищенная концентрированная жидкая. Антитоксин яда гадюки обыкновенной раствор для инъекций 150 AE/доза	8–12	10	1/10	0,8–1,2

рез мембранные фильтры, изготовленные как из смешанных эфиров целлюлозы, так и Durapore® (PVDF). Отличий в испытаниях, проведенных с использованием различных мембранных фильтров, выявлено не было, что свидетельствовало о возможности использования обоих типов мембран в испытании на стерильность данных препаратов.

Все образцы сывороток удовлетворяли требованиям испытания на стерильность.

С целью повышения достоверности результатов испытания была предпринята попытка модифицировать методику.

Учитывая физико-химические особенности сывороточных препаратов (вязкость, способность к набуханию, гидрофобность, высокая молекулярная масса и т.д.), было предложено проводить пробоподготовку предварительным разведением образцов в отдельной стерильной емкости в среднем в 1,5–2 раза стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида.

Проведенные по модифицированной схеме испытания показали, что предварительно разведенные в 1,5–2 раза 0,9 % раствором натрия хлорида образцы гетерологических сывороточных препаратов проходили через мембраны быстрее. Снижение концентрации гидрофобных белков в ходе данной процедуры уменьшает время

контакта с мембраной и создает более щадящие условия для сохранения жизнеспособности возможного контаминанта, что, в свою очередь, позволяет снизить риск получения ложноотрицательных результатов. Тем не менее, введение стадии пробоподготовки в отдельной емкости повышает риск дополнительной контаминации и возможного получения ложноположительных результатов.

Для устранения возможности получения ложных положительных результатов и снижения риска недостоверных, ложных отрицательных результатов было предложено проводить пробоподготовку образцов не в отдельной емкости, как рекомендовано ОФС 1.2.4.003.15 «Стерильность», а непосредственно в канистре фильтроэлемента.

Испытания показали, что при модификации пробоподготовки образцы препаратов распределялись более равномерно, процесс фильтрации проходил по всей площади мембраны, в отличие от стандартной процедуры, при которой фильтрация образца проходит в ограниченной зоне мембраны, куда он поступает из трубки фильтроэлемента. Длительность процедуры сократилась.

Были успешно проведены основные стадии испытания: фильтрация всего содержимого каждой емкости и отмывка мембранных фильтров при испытании препаратов, расфасованных как по 1–2 мл, так и препаратов, упакован-

Таблица 2. Результаты испытания образцов гетерологических сывороток по показателю «Стерильность» методом мембранной фильтрации и прямого посева

№ п/п	Наименование препарата / Количество препарата в емкости / Количество испытанных образцов	Концентрация белка, %*	Объем препарата на мембрану, мл	Белковая нагрузка на мембрану, г _{max}	Результаты испытания стерильности	
					Метод прямого посева	Метод мембранной фильтрации
1	Сыворотка лошадиная очищенная разведенная 1:100, раствор для внутрикожного введения/1,0 мл/10 амп.	0,11	10	0,01	Соответствует стерильно	Соответствует стерильно
2	Сыворотка противостолбнячная лошадиная очищенная концентрированная жидкая (сыворотка противостолбнячная) раствор для внутримышечного и подкожного введения 3000 МЕ/2,5 мл/10 амп.	9,9	25	2,5	Соответствует стерильно	Соответствует стерильно
3	Сыворотка противоботулиническая типа А лошадиная очищенная концентрированная жидкая, 10000 МЕ/мл/8,4 мл/10 мл	9,6	84	8,0	Соответствует стерильно	Соответствует стерильно
4	Сыворотка противоботулиническая типа В лошадиная очищенная концентрированная жидкая, 5000 МЕ/мл/3,6 мл/10 амп.	10,4	36	3,8	Соответствует стерильно	Соответствует стерильно
5	Сыворотка противоботулиническая типа Е лошадиная очищенная концентрированная жидкая, 10000 МЕ/мл /8,4 мл/10 амп.	10	84	8,4	Соответствует стерильно	Соответствует стерильно
6	Сыворотка противогангренозная поливалентная лошадиная очищенная концентрированная. Антитоксин гангренозный раствор для инъекций 30000 МЕ/доза 17,4 мл/5 амп.	13,5	87	12	Соответствует стерильно	Соответствует стерильно
7	Сыворотка противодифтерийная лошадиная очищенная концентрированная. Антитоксин дифтерийный раствор для внутримышечного и подкожного введения 10000 МЕ/6,3 мл/10 амп.	9,3	63	5,8	Соответствует стерильно	Соответствует стерильно
8	Сыворотка против яда гадюки обыкновенной лошадиная очищенная концентрированная жидкая. Антитоксин яда гадюки обыкновенной раствор для инъекций 150 АЕ/доза/1,4 мл/10 амп.	10	14	1,4	Соответствует стерильно	Соответствует стерильно

* Паспортные данные.

ных по 17 мл, т.е. в количестве от 10–20 мл до 85 мл на каждую мембрану. Предложенная пробоподготовка препаратов разведением в 1,5–2 раза 0,9 % раствором натрия хлорида не в отдельной емкости, а непосредственно в канистре фильтроэлемента исключает возможность дополнительной контаминации испытуемого препарата и позволяет проводить фильтрацию предварительно объединенной (общей) пробы по всей площади мембраны, увеличивая «скорость» фильтрации и отмывки мембраны.

Одновременно качество исследуемых гетерологичных сывороток по показателю «Стерильность» оценивали методом прямого посева в соответствии с требованиями НД на соответствующий препарат с использованием аналогичных питательных сред. Использовали соотношение испытуемого образца и питательной среды 1:10. Как видно из данных таблицы 2, результаты испытания препаратов, как методом прямого посева, так и мембранной фильтрации полностью совпадали. Все серии препаратов были стерильными и соответствовали требованиям НД по показателю «Стерильность». Модифицированная методика испытания на стерильность методом мембранной фильтрации с использованием закрытой системы Стеритест Компакт и соответствующей пробоподготовки была апробирована на образцах более 70 серий всех 8 наименований отечественных гетерологичных сывороточных препаратов с белковой нагрузкой до 12 г белка на мембрану. Отличий при испытании различных гетерологичных сывороточных препаратов не установлено.

Показано, что испытание этих препаратов можно проводить методом мембранной фильтрации с помощью закрытой системы с фильтроэлементами из смешанных эфиров целлюлозы или Dugapore® (PVDF), как по традиционной схеме, так и используя ряд модификаций при процедуре пробоподготовки, обеспечивающей снижение концентрации белка, более равномерное распределение препарата по поверхности мембраны, препятствующее закупорке пор фильтра белком, а также увеличение площади фильтрации и создание более щадящих условий для возможного контаминанта. Оптимизированные условия проведения пробоподготовки сывороточных препаратов позволяют повысить достоверность исследования за счет снижения риска получения как ложноотрицательных, так и ложноположительных результатов.

Предлагаемая модификация методики позволяет использовать для проведения испытания по показателю «Стерильность» более надежный и современный метод мембранной фильтрации и может быть рекомендована для включения в НД на соответствующие препараты наряду с используемым в настоящее время методом прямого посева.

Таким образом, результаты проведенной работы позволяют сделать следующие выводы:

1. Определен диапазон белковой нагрузки на мембрану фильтра при испытании сывороточных препаратов по показателю «Стерильность» методом мембранной фильтрации в соответствии с требованиями ГФ XIII, ОФС 1.2.4.003.15 «Стерильность».
2. Доказана возможность проведения испытания отечественных гетерологичных сывороточных препаратов методом мембранной фильтрации с использованием закрытой системы.
3. Установлена возможность использования различных типов фильтроэлементов из смешанных эфиров целлюлозы и Dugapore® (PVDF) для проведения испытания методом мембранной фильтрации гетерологичных сыво-

роточных препаратов с белковой нагрузкой до 12 г белка на мембрану.

4. Разработана модификация методики проведения испытания стерильности гетерологичных сывороток методом мембранной фильтрации путем оптимизации процедуры пробоподготовки, позволяющая снизить риск получения недостоверных результатов.

5. Показана сопоставимость результатов испытаний стерильности гетерологичных сывороточных препаратов методом прямого посева и мембранной фильтрации.

6. Обоснована применимость разработанной методики метода мембранной фильтрации для проведения испытания по показателю «Стерильность» различных отечественных гетерологичных сывороточных препаратов и возможность внесения этого метода в соответствующий раздел НД на препараты.

Литература

1. ОФС. 1.2.4.003.15 «Стерильность». Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. М. 2015. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
2. The International Pharmacopoeia (First and Second Supl.) 4th ed. 2011. Available from: <http://apps.who.int/phint/en/p/about>.
3. European Pharmacopoeia 9.0; 2017: 20601. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
4. Indian Pharmacopoeia, 2.2.11/6.0/2012.
5. Japanese Pharmacopoeia, 4.06/XVI/2012.
6. USP, Американская фармакопея, 35/<71>/2012.
7. Балашенко СГ, Урбан ВП. Иммуные глобулины в ветеринарии. Минск: 1972.
8. Незлин РС. Строение и биосинтез антител. М.: 1972.
9. ФС. 3.3.1.0041.15. Сыворотка противогангренозная поливалентная лошадиная. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. 3. М. 2015. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
10. ФС. 3.3.1.0042.15. Сыворотки противоботулинические типов А, В, Е лошадиные. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. 3. М. 2015. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
11. ФС. 3.3.1.0043.15. Сыворотка противодифтерийная лошадиная. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. 3. М. 2015. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
12. ФС. 3.3.1.0044.15. Сыворотка противостолбнячная лошадиная. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. 3. М. 2015. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
13. ФС. 3.3.1.0045.15. Сыворотка против яда змеи гадюки обыкновенной лошадиная. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. 3. М. 2015. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
14. ФС. 3.3.1.0046.15. Сыворотка лошадиная, разведенная 1:100. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. 3. М. 2015. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
15. Мовсисянц АА, Бондарев ВП, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Шимчук ЛФ. Стандарты качества иммунобиологических лекарственных препаратов — новое в Государственной фармакопее Российской Федерации. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2016; (2): 38–41.
16. Сыворотка лошадиная очищенная разведенная 1:100, ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, Россия, ЛС-000349-010212, Изменения № 1, 2, 3.
17. Сыворотка противоботулиническая типа А лошадиная очищенная концентрированная жидкая, ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, Россия, ЛС-001212-220711, Изменение № 1, 2, 3.
18. Сыворотка противоботулиническая типа В лошадиная очищенная концентрированная жидкая, ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, Россия ЛС-001213-270711, Изменение № 1, 2, 3.
19. Сыворотка противоботулиническая типа Е лошадиная очищенная концентрированная жидкая, ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, Россия ЛС-001214-220711, Изменение № 1, 2, 3.

20. Сыворотка противогангренозная лошадиная очищенная концентрированная жидкая, ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, Россия ЛС-001035-301211, Изменение № 1, 2, 3, 4.
21. Сыворотка противодифтерийная лошадиная очищенная концентрированная жидкая, ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, Россия ЛС-001409-211211, Изменение № 1, 2, 3.
22. Сыворотка противостолбнячная лошадиная очищенная концентрированная жидкая, ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, Россия ЛС-000058-200911, Изменение № 1, 2, 3, 4.
23. Сыворотка против яда гадюки обыкновенной лошадиная очищенная концентрированная жидкая (Антитоксин яда гадюки обыкновенной), ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, Россия Р N002482/01-010212, Изменение № 1.
24. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 28 октября 2015 г. № 770 «О внесении изменений в приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21 ноября 2014 г. № 768 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей».
25. Суханова СМ, Бердникова ЗЕ, Захарова НЕ. Новый подход к испытаниям препаратов лекарственных средств на стерильность. В кн.: Всерос. научн.-практич. конф. «Вакцинология-2010». Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней. М; 2010. С. 108.
26. Система для контроля стерильности лекарственных препаратов Steritest. Available from: <https://goo.gl/5ZRQN8>.

Об авторах

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

Суханова Светлана Михайловна. Начальник лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Бердникова Зинаида Евтропиевна. Главный эксперт лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Адрес для переписки: Суханова Светлана Михайловна; SuhanovaSM@expmed.ru

Development of new approaches to sterility testing of heterologous serum products by membrane filtration method

S. M. Sukhanova, Z. E. Berdnikova

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

Reliable evaluation of blood products sterility is a very important and one of the most complex and critical control methods in the context of microbiological safety. The membrane filtration method that uses a closed-circuit system has, for many years, been the main and the most preferable sterility test method for all known medicinal products. However, Russian manufacturers perform sterility testing of heterologous serum products by direct inoculation method only. The present study was aimed at exploring the feasibility of performing sterility testing of heterologous serum products by membrane filtration. It was shown that sample preparation could be modified by dilution of samples to, on average, 1.5–2 times the initial volume with a sterile 0.9 % sodium chloride solution followed by membrane filtration at a geared-up rate which lowers protein sorption by the membrane filter. The study helped to determine the range of protein impact on the membrane when testing serum products according to the State Pharmacopoeia 13th ed. It was shown that various types of filter elements from mixed cellulose esters and Durapore® (PVDF) could be used to test serum products by membrane filtration with a protein impact range of up to 12 g of protein per membrane. The results of heterologous serum products sterility testing by direct inoculation method and by membrane filtration were found to be comparable. Adaptation of the procedure to protein-containing products makes it possible to perform sterility testing by a more reliable and modern method. The authors can recommend the incorporation of the above-cited test procedure into quality standards for products concerned together with the currently used direct inoculation method.

Key words: microbiological safety; drugs; heterologous serum products; sterility; membrane filtration; quality assessment.

For citation: Sukhanova SM, Berdnikova ZE. Development of new approaches to sterility testing of heterologous serum products by membrane filtration method. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(2): 103–109.

References

1. ОФС. 1.2.4.0003.15. Sterility. State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th ed. V. 3. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
2. The International Pharmacopoeia (First and Second Supl.) 4th ed. 2011. Available from: <http://apps.who.int/phint/en/p/about>.
3. European Pharmacopoeia 9.0; 2017: 20601. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
4. Indian Pharmacopoeia, 2.2.11/6.0/2012.
5. Japanese Pharmacopoeia, 4.06/XVI/2012.
6. USP, the US Pharmacopoeia, 35/<71>/2012.
7. Balashenko SG, Urban VP. Immune globulins in veterinary. Minsk. 1972 (in Russian).
8. Neslin RS. Structure and biosynthesis of antibodies. Moscow. 1972 (in Russian).
9. ФС. 3.3.1.0041.15. Antigangrenous serum polyvalent horse. State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th ed. V. 3. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
10. ФС. 3.3.1.0042.15. Anti-butulinic serum types A, B, E horse. State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th ed. V. 3. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
11. ФС. 3.3.1.0043.15. Serum antidiphtheria horse. State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th ed. V. 3. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
12. ФС. 3.3.1.0044.15. Anti-tetanus horse serum. State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th ed. V. 3. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
13. ФС. 3.3.1.0045.15 Serum against venom of viper ordinary horse. State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th ed. V. 3. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).

14. ФС. 3.3.1.0046.15 Serum horse, diluted 1:100. State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th ed. V. 3. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
15. Movsesyants AA, Bondarev VP, Olefir YuV, Merkulov VA, Shimchuk LF. Quality standards for immunobiological medicinal products — new texts in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2016; (2): 38–41 (in Russian).
16. Serum horse purified diluted 1:100, FSUE «NPO «Microgen» MH RF, Russia, LS-000349-010212, amendments No. 1, 2, 3 (in Russian).
17. Anti-butulinic serum type A horse purified concentrated liquid, FSUE «NPO «Microgen» MH RF, Russia, LS-001212 – 220711, amendments No. 1, 2, 3 (in Russian).
18. Anti-butulinic serum type B horse purified concentrated liquid, FSUE «NPO «Microgen» MH RF, Russia LS-001213 – 270711, Rev. 1, 2, 3 (in Russian).
19. Anti-butulinic serum type E horse purified concentrated liquid, FSUE «NPO «Microgen» MH RF, Russia LS-001214 – 220711, amendments No. 1, 2, 3 (in Russian).
20. Antigangrenous serum horse purified concentrated liquid, FSUE «NPO «Microgen» MH RF, Russia LS-001035 – 301211, amendments No. 1, 2, 3, 4 (in Russian).
21. Serum antidiphtheria horse purified concentrated liquid, FSUE «NPO «Microgen» MH RF, Russia LS-001409 – 211211, amendments No. 1, 2, 3 (in Russian).
22. Anti-tetanus serum horse purified concentrated liquid, FSUE «NPO «Microgen» MH RF, Russia LS-000058 – 200911, amendments No. 1, 2, 3, 4 (in Russian).
23. Serum against venom of viper ordinary horse purified concentrated liquid (Antitoxin venom of viper ordinary), FSUE «NPO «Microgen» MH RF, Russia RN002482/01-010212, amendment No. 1 (in Russian).
24. Order of the Ministry of health of the Russian Federation of 28 October 2015 № 770 «About modification of the order of Ministry of health of the Russian Federation from November 21, 2014 No. 768 «On approval of General Pharmacopoeia articles and Pharmacopoeia articles» (in Russian).
25. Sukhanova SM, Berdnikova ZE, Zacharova NE. A new approach to testing drugs for sterility. In: All-Russia Scientific-practical. conf. «Vaccinology-2010». Perfection of immunobiological means of prevention, diagnosis and treatment of infectious diseases. Moscow; 2010. P. 108 (in Russian).
26. System for controlling the sterility of medicinal products Steritest. Available from: <https://goo.gl/5ZRQN8> (in Russian).

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.

Sukhanova SM. Head of the Laboratory of Bacteriological Culture Media and Cell Cultures of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Berdnikova ZE. Chief expert of the Laboratory of Bacteriological Culture Media and Cell Cultures of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Contact e-mail: Sukhanova Svetlana Mikhailovna; SuhanovaSM@expmed.ru

Изучение возможности увеличения срока годности стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплемментарной активности

О. Г. Корнилова, М. А. Кривых, Е. А. Хуснатдинова, Е. С. Коновалова, Р. А. Волкова,
О. В. Фадейкина, Э. Ю. Кудашева, А. А. Мовсесянц

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

Поступила 05.04.2017 г. Принята к публикации 14.04.2017 г.

Представлены материалы по изучению стабильности двух серий стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплемментарной активности (ОСО 42-28-430). Показана стабильность характеристик первой серии стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплемментарной активности в течение 30 месяцев хранения при температуре $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$, что позволяет увеличить срок использования стандартного образца с 18 месяцев (первоначальный срок наблюдения) до 30 месяцев хранения с момента первичного установления аттестуемой характеристики при допустимом диапазоне значений для положительного контроля — более 50 %, для отрицательного контроля — менее 50 %. На основании полученных результатов после 18 месяцев использования второй серии стандартного образца проведена его повторная аттестация. Установлен диапазон значений основной аттестованной характеристики: антикомплемментарная активность отрицательного контроля составила $41,6 \pm 7,2$ %, положительного контроля — $75,7 \pm 6,8$ % при доверительной вероятности 0,95. Срок использования второй серии стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплемментарной активности (ОСО 42-28-430) продлен до 02.2018 г., что составляет 30 месяцев.

Ключевые слова: стандартный образец; препараты иммуноглобулинов человека; антикомплемментарная активность; срок использования.

Библиографическое описание: Корнилова ОГ, Кривых МА, Хуснатдинова ЕА, Коновалова ЕС, Волкова РА, Фадейкина ОВ, Кудашева ЭЮ, Мовсесянц АА. Изучение возможности увеличения срока годности стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплемментарной активности. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(2): 110–115.

Жесткие требования безопасности иммуноглобулинотерапии обуславливают необходимость особого контроля препаратов иммуноглобулинов человека. Описание профиля их безопасности является неотъемлемой частью процесса управления рисками [1]. Современная практика экспертизы качества предъявляет все более четкие требования к методам и методикам, используемым при оценке качества лекарственных средств. Немаловажная роль в совершенствовании процедур испытаний, наряду с использованием современного оборудования и реактивов, отводится внедрению стандартных образцов (СО) качества лекарственных средств [2].

В 2015 г. впервые в Российской Федерации разработан отечественный СО для определения антикомплемментарной активности (АКА), представляющий собой комплект, состоящий из отрицательного и положительного контролей, используемый для оценки стабильности и приемлемости результатов испытаний [3, 4]. Разработка, аттестация и применение фармакопейных СО в системе стандартизации лекарственных средств и последующем подтверждении их качества является надежным гарантом соответствия отечественных препаратов требованиям международных стандартов [3, 5, 6]. До настоящего времени аттестовано две серии СО иммуноглобулина человека для определения АКА с установленным сроком годности 18 месяцев (срок наблюдения). Международный опыт разработки и применения СО, применяемых для контроля качества биологических лекарственных препаратов, свиде-

тельствует о стабильности их свойств на протяжении длительного времени [7, 8]. Так, СО иммуноглобулина человека для определения АКА, утвержденный Европейским директором по качеству лекарственных средств и здравоохранения (EDQM), не имеет ограниченного срока годности при соблюдении температурного режима хранения [9]. Следует отметить, что этот СО имеет широкий диапазон аттестованных значений антикомплемментарной активности: для положительного контроля — от 60 до 100 %, для отрицательного — от 10 до 40 %, что нивелирует изменения активности при хранении и снижает значимость такого СО для подтверждения правильности выполнения методики.

Цель настоящего исследования — изучение стабильности стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплемментарной активности в реальном времени и оценка возможности увеличения его срока годности.

Материалы и методы

Материалы

В работе использовали:

- гемолитические сыворотки производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия;
- пулированный (in house) комплемент морских свинок [4];

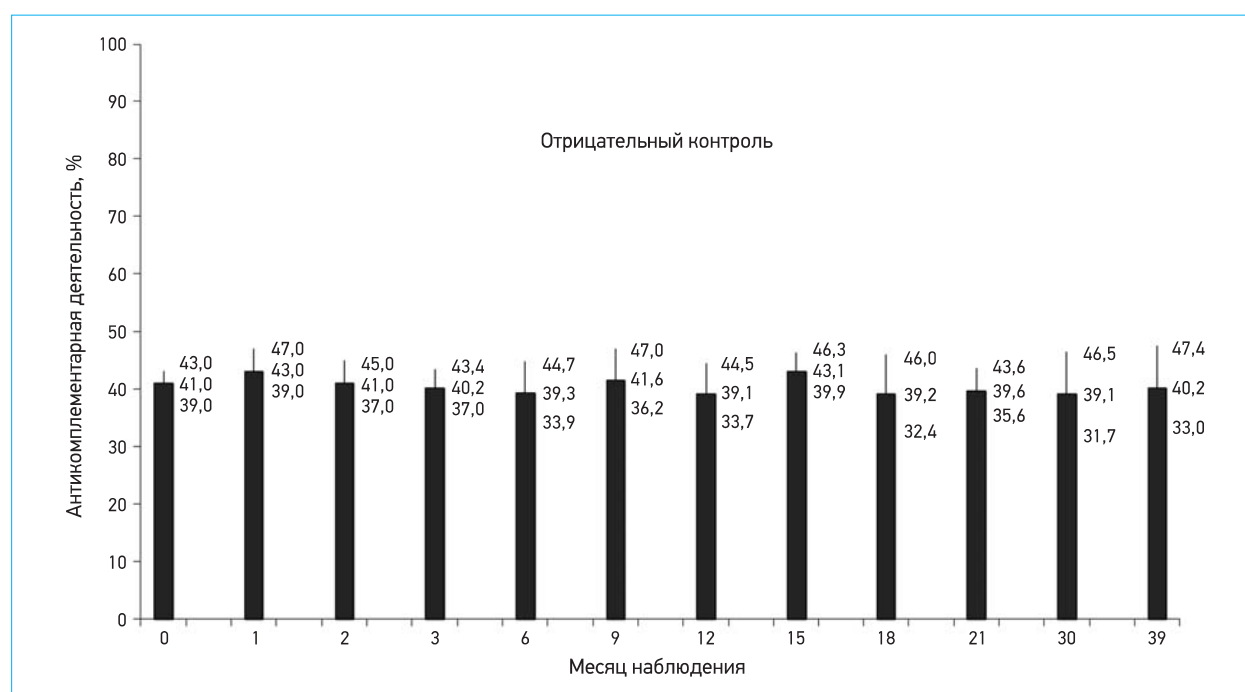


Рис. 1. Изучение стабильности антикомплементарных свойств отрицательного контроля стандартного образца иммуноглобулина человека, серия 1.

- кровь баранью дефибринированную с цитратом натрия, производства ЗАО «ЭКОлаб», Россия;
- отраслевой стандартный образец иммуноглобулина человека ОСО 42-28-430-2015 (серия 1) с аттестованным значением антикомплементарной активности: отрицательного контроля — $41,5 \pm 3,6$ %; положительного контроля — $78,2 \pm 4,6$ % с доверительной вероятностью 0,95;
- отраслевой стандартный образец иммуноглобулина человека ОСО 42-28-430-2016 (серия 2) с аттестованным значением антикомплементарной активности: отрицательного контроля — $40,5 \pm 7,2$ %; положительного контроля — $76,6 \pm 6,2$ % с доверительной вероятностью 0,95;
- отраслевой стандартный образец содержания белка в иммуноглобулине ОСО 42-28-340 с аттестованным значением содержания белка $10,0 \pm 0,27$ % с доверительной вероятностью 0,95;
- стандартный образец иммуноглобулина человека (АКА и молекулярные параметры) BRP, серия 1 (кат.

№ Y0001504), утвержден Европейским директором по качеству лекарственных средств и здравоохранения, Франция, 2011 г. [9].

Методы

Антикомплементарную активность определяли в реакции связывания комплемента [4]; содержание белка — колориметрическим методом с биуретовым реактивом [10]. Расчет статистических параметров (среднего значения, стандартного отклонения, доверительного интервала) с доверительной вероятностью 0,95 выполняли по Гланцу [11], используя программное обеспечение MS Excel 2007.

Результаты и обсуждения

Стабильность основной аттестованной (АКА) и дополнительной (содержание белка) характеристик СО иммуноглобулина человека, серия 1 изучали методом естествен-

Таблица 1. Изучение стабильности стандартного образца для определения антикомплементарной активности, серия 1

Наименование аттестуемой характеристики, единица измерения	Срок хранения, мес.											
	0 (n = 3)	1 (n = 9)	2 (n = 12)	3 (n = 12)	6 (n = 12)	9 (n = 3)	12 (n = 3)	15 (n = 5)	18 (n = 6)	21 (n = 5)	30 (n = 3)	39 (n = 2)
АКА положительного контроля СО, процент, $\bar{x} \pm 2S_x$	79,0±0,6	76,0±4,0	80,0±2,0	78,2±3,6	78,9±6,8	78,6±2,2	80,0±2,8	79,4±4,2	76,9±4,4	71,9±6,0	67,3±5,6	69,2±5,8
АКА отрицательного контроля СО, процент, $\bar{x} \pm 2S_x$ (n = 3)	41,0±2,0	43,0±4,0	41,0±4,0	40,2±3,2	39,3±5,4	41,6±5,4	39,1±5,4	43,1±3,2	39,2±6,8	39,6±4,0	39,1±7,4	40,2±7,2
Содержание белка*, мг/мл, $\bar{x} \pm S_x$ (n = 3)	101,0±1,0	101,0±0,7	102,0±1,3	103,0±0,5	103,0±0,6	102,0±0,8	100,0±0,9	102,0±0,8	101,0±0,4	102,0±2,0	101,0±0,84	102,0±0,3
Описание	Прозрачная бесцветная жидкость											

* Среднее значение ($\bar{x} \pm S_x$) содержания белка в положительном и отрицательном контролях.

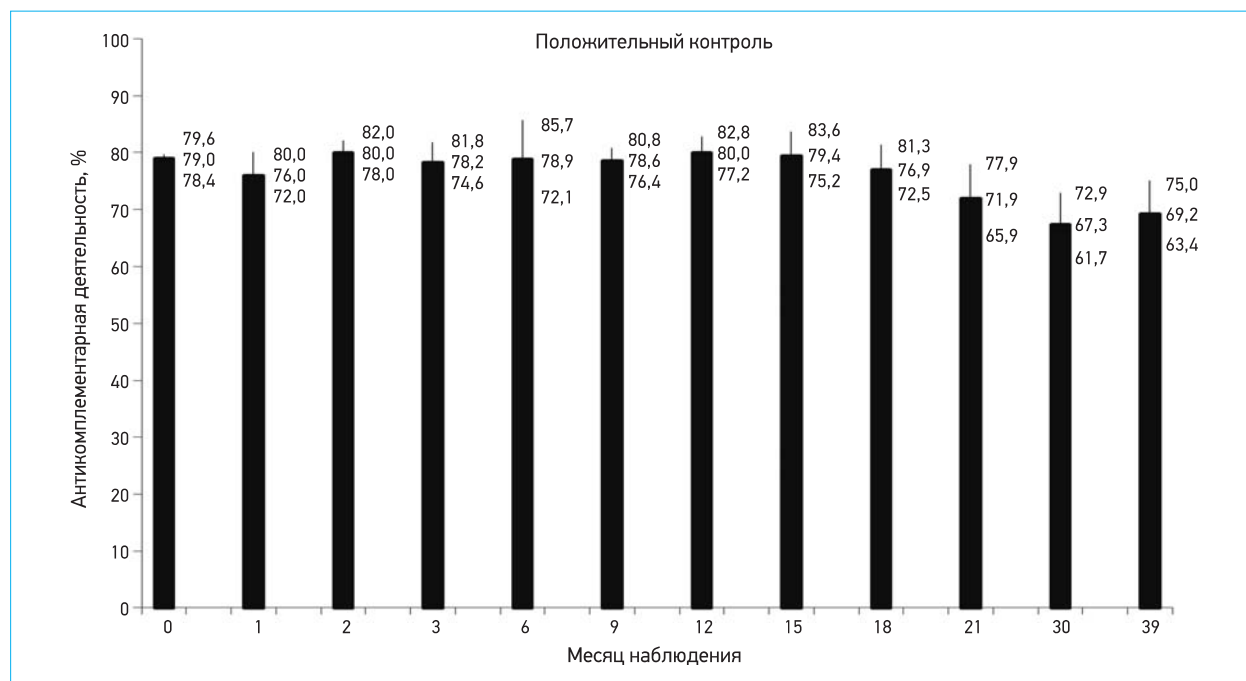


Рис. 2. Изучение стабильности антикомплементарных свойств положительного контроля стандартного образца иммуноглобулина человека, серия 1.

ного старения при температуре хранения (5 ± 3) °C (табл. 1). Антикомплементарная активность положительного и отрицательного контролей соответствовала аттестованному диапазону в течение 18 месяцев хранения (срок наблюдения). Дальнейшее наблюдение показало постепенное снижение среднего значения АКА положительного контроля на 4,7 %, 9,3 % и 7,4 % при хранении в течение 21, 30 и 39 месяцев соответственно. Изменение среднего значения АКА отрицательного контроля было менее выраженным и составило не более 1,4 % (рис. 1, 2). Изменения аттестованной характеристики при хранении не превышали 10 %, полученные результаты удовлетворяли требованиям, предъявляемым к положительному и отрицательному контролям СО: положительный контроль имеет значение антикомплементарной активности в диапазоне более 50 %, а отрицательный — менее 50 % [3]. Для увеличения срока использования СО по истечении 18 месяцев его хранения с момента первичного установления аттестуемой характеристики были проведены повторные исследования второй серии.

Значения дополнительной характеристики (содержание белка) оставались стабильными на протяжении 39 месяцев (табл. 1). Полученные средние значения антикомплементарной активности СО иммуноглобулина человека, серия 2, находились в аттестованном диапазоне (табл. 2). Для положительного контроля средние значения составили от 70,4 до 80,8 % при аттестованном значении $76,6\pm 6,2$ %, для отрицательного контроля — от 41,2 до 46,4 % при аттестованном значении $40,5\pm 7,2$ %. При этом наблюдалось изменение общего среднего значения антикомплементарной активности, что, видимо, связано с привлечением новых исполнителей (исполнители 3 и 4) к проведению испытаний. Поскольку изменения общего среднего значения не превысили 1,1 %, полученные результаты позволили продлить срок использования СО

на 12 месяцев, но с корректировкой диапазонов значений аттестованной характеристики: отрицательный контроль — $41,6\pm 7,2$ %, положительный контроль — $75,7\pm 6,8$ % с доверительной вероятностью 0,95.

Установленный более узкий диапазон значений аттестованной характеристики по сравнению с допустимым диапазоном СО иммуноглобулина человека для определения АКА, утвержденного EDQM, представляет более строгий инструмент для оценки стабильности проведения испытаний, что способствует стандартизации методики и, соответственно, получению сопоставимых результатов в различных лабораториях.

Выводы

1. Изучена стабильность характеристик СО иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности (серия 1) в течение 39 месяцев хранения при температуре (5 ± 3) °C.

2. Обоснована возможность увеличения срока использования СО с 18 до 30 месяцев хранения с момента первичного установления аттестуемой характеристики с корректировкой диапазона значений аттестованной характеристики.

3. Установлены значения аттестованной характеристики СО 42-28-430, серия 2: АКА отрицательного контроля составляет $41,6\pm 7,2$ %, положительного контроля — $75,7\pm 6,8$ % с доверительной вероятностью 0,95.

Литература

1. Казаков АС, Затолочина КЗ, Романов БК, Букатина ТМ, Вельц НЮ. Система управления рисками — важная часть Правил надлежащей практики фармаконадзора (GVP). Безопасность и риск фармакотерапии 2016; (1): 21–7.
2. Миронов АН, Сакаева ИВ, Саканян ЕИ, Буянтян НД, Ковалева ЕЛ, Митькина ЛИ и др. Стандартные образцы в практи-

Таблица 2. Изучение антикомплемментарной активности стандартного образца иммуноглобулина человека, серия 2

Исполнитель	Антикомплемментарная активность СО иммуноглобулина человека BRP, процент		Антикомплемментарная активность СО иммуноглобулина человека (серия 2), процент			
	Отрицательный контроль	Положительный контроль	Отрицательный контроль		Положительный контроль	
			Х	($\pm S_x$)	Х	($\pm S_x$)
Исполнитель 1	15,7	64,9	40,6	41,0 $\pm$ 4,4	81,0	77,9 $\pm$ 3,5
	25,5	73,4	45,4		81,7	
	19,8	69,8	41,1		86,2	
			39,8		80,4	
	29,6	89,9	47,1		76,9	
			46,9		78,3	
	24,3	89,6	44,2		74,3	
			41,9		74,8	
			38,4		75,6	
	21,4	85,5	39,4		75,7	
			41,2		74,3	
			34,4		77,5	
			32,5		76,1	
Исполнитель 2	20,3	65,5	36,9	40,0 $\pm$ 2,9	77,5	75,6 $\pm$ 2,3
	18,1	67,4	40,8		77,2	
			43,6		73,7	
	17,4	65,2	35,6		77,2	
			37,0		73,7	
	27,3	88,7	43,6		74,3	
			46,1		76,4	
			40,1		78,8	
	24,2	86,6	39,2		74,1	
			40,9		71,3	
			40,9		72,7	
	18,3	87,2	38,3		74,9	
			40,5		74,6	
			39,5		78,0	
			37,4		79,0	
Исполнитель 3	13,8	82,5	45,0	43,8 $\pm$ 2,0	74,8	73,3 $\pm$ 2,3
	17,0	78,3	45,0		74,6	
	17,0	78,3	42,4		70,6	
			42,7		73,1	
	17,3	78,7	41,2		70,4	
			46,6		76,0	
Исполнитель 4	17,3	78,7	46,3	44,6 $\pm$ 1,8	71,1	73,6 $\pm$ 3,7
	17,8	80,5	43,6		80,8	
			46,4		71,2	
	21,6	79,8	45,5		73,5	
			42,0		73,9	
	13,7	77,3	43,8		71,3	

- не зарубежного и отечественного фармацевтического анализа. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения* 2012; (3): 56–60.
3. Кривых МА, Корнилова ОГ, Бунятян НД, Кудашева ЭЮ, Рунова ОБ, Малкова ВИ, Устинникова ОБ. Разработка стандартного образца для определения антикомплемментарной активности препаратов иммуноглобулинов человека. *Химико-фармацевтический журнал* 2015; 49(6): 40–2.
 4. ОФС. 1.8.2.0007.15. Определение антикомплемментарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2. М.; 2015. С. 937–49. Available from: <http://femb.ru/feml>.
 5. Меркулов ВА, Саканян ЕИ, Волкова РА, Климов ВИ, Шемерякина ТБ, Яшкир ВА. Фармакопейные стандартные образцы и практика их применения в отечественной системе стандартизации лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал* 2016; 50(4): 40–3.
 6. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Климов ВИ, Саканян ЕИ, Олефир ЮВ, Меркулов ВА и др. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2016; 16(4): 229–36.
 7. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). Available from: <https://www.edqm.eu>.
 8. National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Available from: <https://goo.gl/6kDVFZ>.
 9. Sandberg E, Costanzo A, Daas A, Buchheit KH. Calibration of the human immunoglobulin BRPs for ACA and molecular size (batch 1) and for Fc function and molecular size (batches 1 & 2). *Pharmeur Bio Sci Notes*. 2012; 1–15.
 10. ОФС. 1.2.3.0012.15. Определение белка. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. М.; 2015. С. 757–72. Available from: <http://femb.ru/feml>.
 11. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999.

Об авторах

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

Корнилова Ольга Геннадьевна. Главный эксперт лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Кривых Максим Андреевич. Ведущий эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля МИБП.

Хуснатдинова Екатерина Александровна. Эксперт 1 категории лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Коновалова Екатерина Сергеевна. Инженер-лаборант лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Волкова Рауза Асхатовна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р. биол. наук.

Фадейкина Ольга Васильевна. Главный технолог Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Кудашева Эльвира Юрьевна. Начальник лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Мовсесянц Арташес Авакович. Начальник Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р. мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Корнилова Ольга Геннадьевна, Kornilova@expmed.ru

Contemplation of the possibility of extending the shelf life of human immunoglobulin reference standard used for determination of anticomplementary activity

O. G. Kornilova, M. A. Krivikh, E. A. Husnatdinova, E. S. Konovalova, R. A. Volkova,
O. V. Fadeykina, E. Yu. Kudasheva, A. A. Movsesyants

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

The article gives an account of the stability study performed for two batches of human immunoglobulin reference standard (RS) used for determination of anticomplementary activity (industry reference standard, IRS 42-28-430). The first batch of human immunoglobulin reference standard used for determination of anticomplementary activity showed sustainable results during 30 months of storage at $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ which makes it possible to extend the RS shelf life from 18 months (corresponding to the initial monitoring period) to 30 months from the date of determining the certified parameter, given the acceptable range of more than 50 % for the positive control and less than 50 % for the negative control. Based on the results obtained, the re-certification was performed for the second RS batch after 18 months of storage. The main certified parameter (anticomplementary activity) of the negative control was within the range of $41.6 \pm 7.2\%$, and of the positive control $75.7 \pm 6.8\%$ for the confidence level of 0.95. Therefore, the shelf life of the second batch of the human immunoglobulin reference standard used for determination of anticomplementary activity (IRS 42-28-430) was extended until February 2018, which makes 30 months.

Key words: reference standard; human immunoglobulin products; anticomplementary activity; shelf life.

For citation: Kornilova OG, Krivikh MA, Husnatdinova EA, Konovalova ES, Volkova RA, Fadeykina OV, Kudasheva EYu, Movsesyants AA. Contemplation of the possibility of extending the shelf life of human immunoglobulin reference standard used for determination of anticomplementary activity. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(2): 110–115.

References

1. Kazakov AS, Zatolochina KE, Romanov BK, Bukatina TM, Velts NYu. The risk management system is the important part of good pharmacovigilance practices (GVP). *Safety and Risk of Pharmacotherapy* 2016; (1): 21–7 (in Russian).
2. Mironov AN, Sakaeva IV, Sakanyan EI, Bunyatyan ND, Kovaleva EL, Mit'kina LI, et al. Reference standards in international and domestic pharmaceutical analysis. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2012; (3): 56–60 (in Russian).
3. Krivykh MA, Kornilova OG, Bunyatyan ND, Kudasheva EYu, Runova OB, Malkova VI, Ustinnikova OB. Development of a reference standard for the determination of human immunoglobulin anti-complementary activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2015; 49(6): 40–2 (in Russian).
4. ОФЦ. 1.8.2.0007.15. Determination of the anticomplementary activity of human immunoglobulin-containing medicinal products for intravenous administration. *The State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 13th edition. V. 2. Moscow; 2015. P. 937–49. Available from: <http://femb.ru/feml> (in Russian).
5. Merkulov VA, Sakanyan EI, Volkova RA, Klimov VI, Shemeryankina TB, Yashkir VA. *Pharmacopoeia standard samples and their practical application in the national drug standardization system*. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2016; 50(4): 40–3 (in Russian).
6. Volkova RA, Fadeikina OV, Klimov VI, Sakanyan EI, Olefir YuV, Merkulov VA, et al. Topical issues related to reference standards in the sphere of circulation of biological products. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(4): 229–36 (in Russian).
7. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). Available from: <https://www.edqm.eu>.
8. National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Available from: <https://goo.gl/6kDVFZ>.
9. Sandberg E, Costanzo A, Daas A, Buchheit KH. Calibration of the human immunoglobulin BRPs for ACA and molecular size (batch 1) and for Fc function and molecular size (batches 1 & 2). *Pharmeur Bio Sci Notes*. 2012; 1–15.
10. ОФЦ. 1.2.3.0012.15. Determination of protein. *The State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 13th edition. V. 1. Moscow; 2015. P. 757–72. Available from: <http://femb.ru/feml> (in Russian).
11. Glantz SA. *Primer of biostatistics*. Moscow: Praktika; 1999 (in Russian).

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.

Kornilova OG. Chief expert of the Laboratory of Immunoglobulins and Blood Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Krivykh MA. Leading expert of the Division for Expert Evaluation of Allergenes, Cytokines and Other Immunomodulators of the Center for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products.

Husnatdinova EA. Expert of the Laboratory of Immunoglobulins and Blood Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Konovalova ES. Engineering technician of the Laboratory of Immunoglobulins and Blood Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Volkova RA. Head of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Biological Sciences.

Fadeykina OV. Chief technologist of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Kudasheva EYu. Head of the Laboratory of Immunoglobulins and Blood Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Movsesyants AA. Head of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Medical Sciences, Professor.

Contact e-mail: Kornilova Olga Gennadyevna; Kornilova@expmed.ru

Особенности аттестации и перспективы применения стандартного образца тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза

О. Г. Корнилова, И. Л. Арефьева, Е. С. Коновалова, Р. А. Волкова, О. В. Фадейкина,
Э. Ю. Кудашева, А. А. Мовсесянц

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

Поступила 18.04.2017 г. Принята к публикации 14.04.2017 г.

Представлены материалы по аттестации новой серии «Стандартного образца тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза» ОСО 42-28-77 в соответствии с современными требованиями. В качестве кандидата в стандартный образец использованы серия нормальной сыворотки крови человека для диагностических целей (более 500 доноров) и серия сыворотки для иммуноэлектрофореза против сывороточных белков крови человека (антисыворотка к сывороточным белкам крови человека). В соответствии с Программой аттестации определен фракционный (антигенный) состав кандидата в стандартный образец методом иммуноэлектрофореза с использованием буфера «КлиниТест-ЭФ» и 0,05 М боратного буферного раствора в режимах, регламентированных ОФС. 1.8.2.0002.15 «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Компонент стандартного образца «антисыворотка к сывороточным белкам крови человека» в реакции с компонентом стандартного образца «нормальная сыворотка крови человека» выявляет не менее 15 линий преципитации. Показана перспективность применения красителя бромфеноловый синий для оценки миграции альбумина с использованием буфера «КлиниТест-ЭФ», а также красителя пиронин В для оценки миграции иммуноглобулина с использованием буферов «КлиниТест-ЭФ» и 0,05 М боратного. Подтверждены критерии возможности использования аттестованного стандартного образца тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза, а также установлены критерии его использования для подтверждения их подлинности (видоспецифичности) не только методом иммуноэлектрофореза, но и методом иммунодиффузии в агаре.

Ключевые слова: стандартный образец тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава; препараты крови; препараты иммуноглобулинов человека; иммуноэлектрофорез; иммунодиффузия; подлинность (видоспецифичность); буферный раствор; краситель.

Библиографическое описание: Корнилова ОГ, Арефьева ИЛ, Коновалова ЕС, Волкова РА, Фадейкина ОВ, Кудашева ЭЮ, Мовсесянц АА. Особенности аттестации и перспективы применения стандартного образца тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(2): 116–121.

Иммуноглобулины человека представляют собой высокоочищенную иммунологически активную белковую фракцию сыворотки или плазмы крови человека. Современные технологии позволяют получать препараты иммуноглобулинов с высокой степенью очистки при сохранении эффективности их клинического применения. Жесткие требования безопасности иммуноглобулинотерапии обуславливают необходимость особого контроля качественного состава препаратов иммуноглобулинов человека. Описание профиля безопасности лекарственных препаратов является неотъемлемой частью процесса управления рисками [1]. Одним из показателей, определяющих профиль безопасности препаратов иммуноглобулинов человека и характеризующих наличие в них примесей, является «Фракционный состав». В соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации XIII издания (ГФ XIII) фракционный состав препаратов иммуноглобулинов человека необходимо определять методом иммуноэлектрофореза в геле [2, 3]. Европейская фармакопея также предусматривает идентификацию иммуноглобулинов и других

белков плазмы крови в составе препаратов иммуноглобулинов человека методом иммуноэлектрофореза [4, 5].

Иммуноэлектрофорез является качественным методом, сочетающим две процедуры: гель-электрофорез и последующую иммунодиффузию. Гель-электрофорез основан на способности заряженных частиц к перемещению в агаровом геле под действием электрического поля. Для последующей иммунодиффузии сыворотку против сывороточных белков крови человека вносят в траншею, расположенную параллельно направлению электрофоретического разделения белковых фракций. При встрече антигена с антителом образуются линии преципитации. По количеству линий преципитации с сывороткой против сывороточных белков крови человека оценивают степень чистоты препарата.

Для полного разделения белковых компонентов препаратов крови необходимо соблюдение условий их электрофоретического разделения (сила тока, напряжение, время, температурные условия проведения электрофореза). Эффективность иммунохимических методов зависит

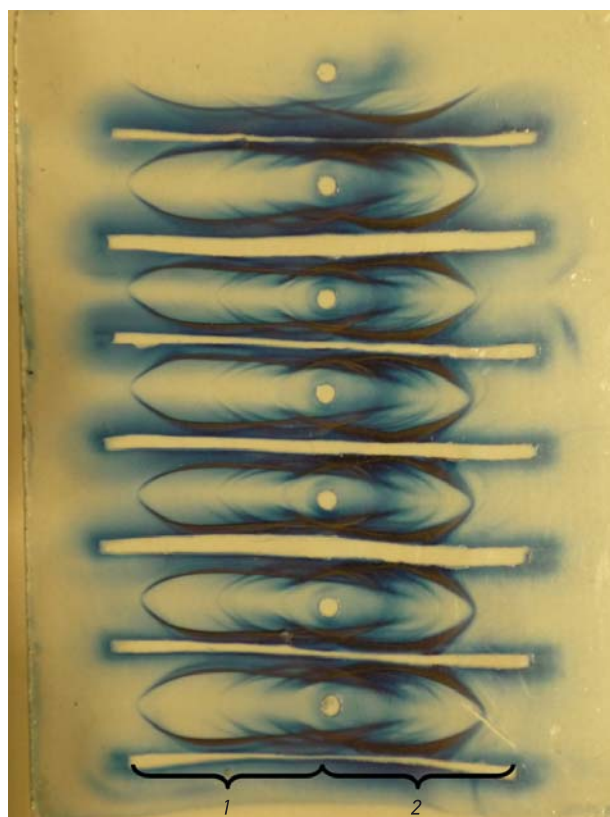


Рис. 1. Иммуноэлектрофореграммы кандидата в «Стандартный образец тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза» при использовании буфера «КлиниТест-ЭФ»: 1 — фракции иммуноглобулинов классов G, A, и M и β -глобулинов (β -липопротеин, трансферрин, гемопексин и др.); 2 — фракции преальбумина, альбумина, α 1-глобулинов (α 1-антитрипсин, α 1-липопротеин) и α 2-глобулинов (гаптоглобин, церулоплазмин, α 2-макроглобулин и др.)

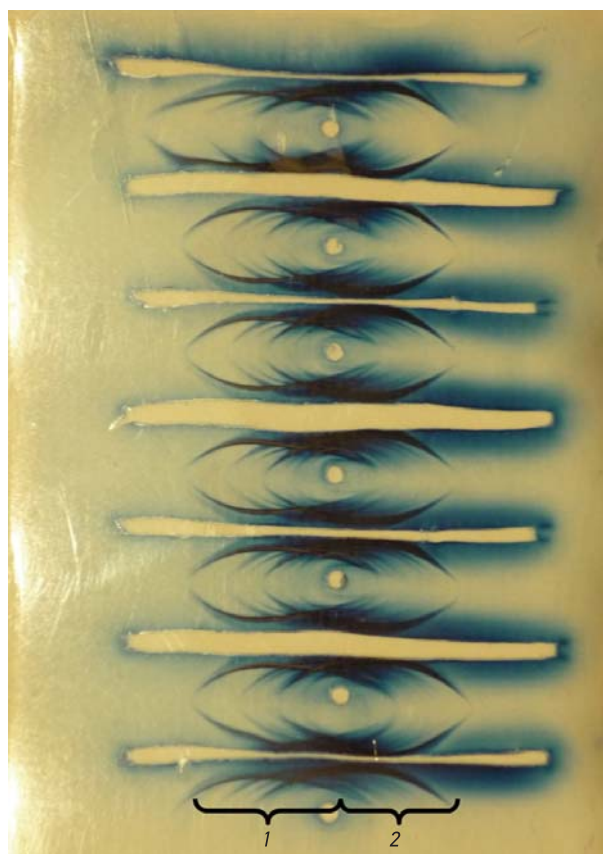


Рис. 2. Иммуноэлектрофореграммы кандидата в «Стандартный образец тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза» при использовании 0,05 М боратного буфера: 1 — фракции иммуноглобулинов классов G, A, и M и β -глобулинов (β -липопротеин, трансферрин, гемопексин и др.); 2 — фракции преальбумина, альбумина, α 1-глобулинов (α 1-антитрипсин, α 1-липопротеин) и α 2-глобулинов (гаптоглобин, церулоплазмин, α 2-макроглобулин и др.)

от многих факторов: специфичности используемых анти-сывороток, адекватности соотношения антигена и антитела (в данном случае белков сыворотки/плазмы крови и анти-сывороток к ним). Учет результатов при исследовании фракционного состава препаратов иммуноглобулинов человека проводят путем сравнения иммуноэлектрофореграммы испытуемого образца с иммуноэлектрофореграммой контрольного/стандартного образца.

Стандартизация фармакопейной методики обеспечивается применением стандартного образца (СО) [6]. Применение компонента стандартного образца «антисыворотка к сывороточным белкам крови человека» позволяет установить принадлежность компонентов препарата иммуноглобулинов к соответствующей группе белков сыворотки/плазмы крови; применение компонента «нормальная сыворотка крови человека» позволяет подтвердить полноту их электрофоретического разделения (чувствительность метода).

Классическая методика иммуноэлектрофореза по Грабару и Уиллиамсу, подробно описанная Х. Фримелем [7], предусматривает использование барбиталового буфера. Ввиду ограничения возможности применения наркотических средств, для метода иммуноэлектрофореза необходима замена барбиталового буферного раствора (с обоснованием) на альтернативный буферный раствор. Кроме того, необходима оценка возможности применения с но-

вым буфером различных маркеров продвижения фракций сыворотки крови при электрофоретическом разделении.

В настоящее время отечественные требования к аттестации и оформлению технической документации на СО для контроля биологических лекарственных средств гармонизированы с международными, что предопределяет наличие особенностей в процедуре аттестации и оформлении документации на выпускаемые СО [8].

Цель настоящего исследования — проведение аттестации новой серии «Стандартного образца тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза» в соответствии с современными требованиями и изучение его возможного дополнительного применения.

Материалы и методы

Материалы

Стандартный образец тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза является СО, рекомендованным для применения при исследовании фракционного состава препаратов крови человека. Он состоит из двух отдельных компонентов —

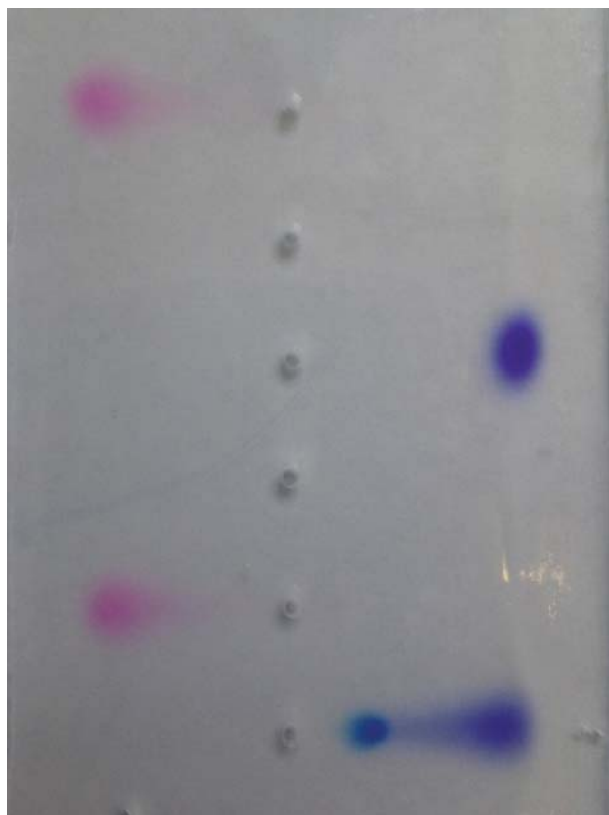


Рис. 3. Результаты электрофореза нормальной сыворотки крови человека для диагностических целей, окрашенной бромфеноловым синим и пиронином В, с использованием буфера «КлиниТест-ЭФ».

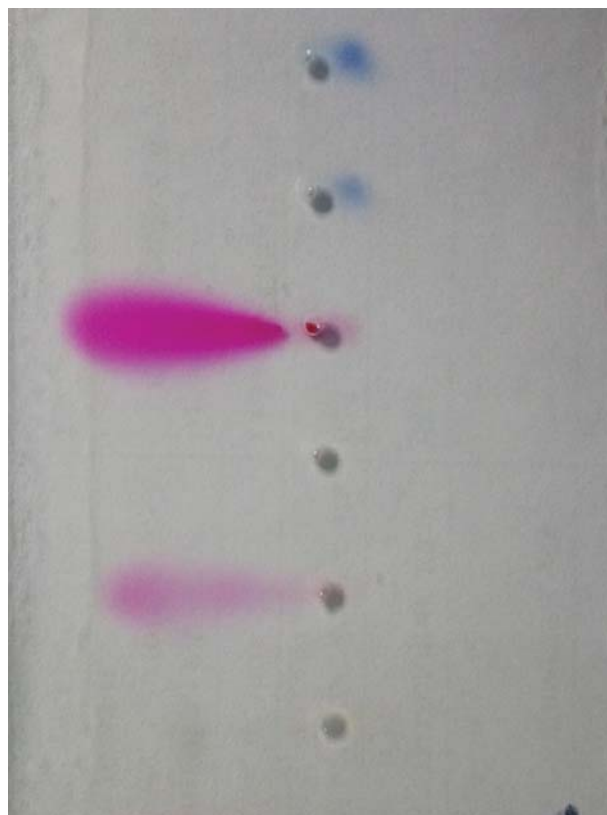


Рис. 4. Результаты электрофореза нормальной сыворотки крови человека для диагностических целей, окрашенной бромфеноловым синим и пиронином В, с использованием 0,05 М боратного буферного раствора.

нормальной сыворотки/плазмы крови человека и поливалентной антисыворотки к сывороточным белкам крови человека. В качестве кандидатов в СО были использованы:

1) Нормальная сыворотка крови человека для диагностических целей (смесь сывороток более 500 доноров), серия 1-2016, выпущена 07.2016, производитель ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства».

2) Набор реагентов Поли-ИЭФ Сыворотка для иммуноэлектрофореза против сывороточных белков крови человека сухая (антисыворотка к сывороточным белкам крови человека), серия Н12-0216, выпущена 02.2016, производитель ФГУП «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации, соответствует ТУ 9389-147-14237183-2009, изменения № 1, 2, 3. Сыворотка для ИЭФ представляет собой поливалентную иммунную сыворотку крови овец, иммунизированных нормальной сывороткой крови человека, содержит антитела против белков сыворотки крови человека.

В работе использовали Бактоагар BD, Франция; «КлиниТест-ЭФ Буфер» буферный раствор для электрофореза (5-кратный концентрат), pH $8,6 \pm 0,1$ (НПЦ «ЭКОсервис», Россия); «КлиниТест-ЭФ П Амидо» краситель Амидо черный 10Б (НПЦ «ЭКОсервис», Россия); «КлиниТест-ЭФ ПР» Промывающий раствор для электрофореза (НПЦ «ЭКОсервис», Россия); 0,05 М боратный буферный раствор

(pH $8,6 \pm 0,1$); пиронин В («Sigma-Aldrich», США); бромфеноловый синий водорастворимый («ПанЭко», Россия).

Методы

Фракционный (антигенный) состав кандидата в стандартный образец изучали методом иммуноэлектрофореза в агаровом геле [9]. Оценку относительного содержания основных белковых фракций в нормальной сыворотке крови человека осуществляли методами электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы и электрофореза в агарозном геле [10].

Результаты и обсуждения

Аттестация СО для контроля качества биологических лекарственных препаратов, как правило, осуществляется с использованием той же методики, для которой и предназначен СО, что обуславливает зависимость значения аттестуемой характеристики от методики испытаний, используемой для аттестации (стандартным образцом, по сути, является комплекс образца и методики) [11]. Основной задачей аттестации «Стандартного образа тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза» являлось установление количества линий преципитации, выявляемых методом иммуноэлектрофореза. Дополнительно оценили перспективность использования альтернативного буферного раствора — буфера «КлиниТест-ЭФ», а также различных красителей для контроля времени проведения электрофореза.

Таблица 1. Содержание основных белковых фракций в нормальной сыворотке крови человека (кандидат в стандартный образец)

Наименование белковой фракции	Содержание белковой фракции, процент, $\bar{x} \pm S_x$ ($n = 3$)		Содержание белковой фракции в нормальной сыворотке, процент
	электрофорез на пленках из ацетата целлюлозы	электрофорез в агарозном геле	
Альбумины	59,5±2,1	61,6±1,9	От 52,0 до 65,0
α 1-глобулины	3,8±0,9	4,2±1,1	От 2,5 до 5,0
α 2-глобулины	8,4±1,6	7,8±0,8	От 7,0 до 13,0
β -глобулины	10,5±2,0	10,8±1,2	От 8,0 до 14,0
γ -глобулины	17,8±1,3	17,4±1,5	От 12,0 до 22,0

Образцы кандидата в «Стандартный образец тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза» проявляли не менее 15 линий преципитации, соответствующих иммуноглобулинам классов G, A и M, α 1-глобулинам (α 1-антитрипсин, α 1-липопротеин), α 2-глобулинам (гаптоглобин, церулоплазмин, α 2-макроглобулин и др.), β -глобулинам (β -липопротеин, трансферрин, гемопексин и др.), предальбумину, альбумину и другим фракциям (рис. 1, 2). Установлено, что для оценки миграции альбумина с использованием буфера «КлиниТест-ЭФ» возможно использование бромфенолового синего, который служит маркером продвижения к аноду альбуминовой фракции, и пиронина В, который позволяет оценить продвижение иммуноглобулинов к катоду (рис. 3). При использовании 0,05 М боратного буферного оказалось возможным оценить скорость продвижения только иммуноглобулинов с помощью пиронина В (рис. 4). Относительное содержание основных белковых фракций в сыворотке крови (компонент СО) соответствует нормальному распределению фракций в нормальной сыворотке крови человека (табл. 1).

Результаты аттестации кандидатов в «Стандартный образец тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза»: Нормальная сыворотка крови человека для диагностических целей, серия 1-2016 и набор реагентов Поли-ИЭФ Сыворотка для иммуноэлектрофореза против сывороточных белков крови человека сухая, серия Н12-0216, дали основание рекомендовать их как компоненты «Стандартного образца тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза» (ОСО 42-28-77-2016). Специфичность связывания в реакции иммунопреципитации компонентов СО (антисыворотки к сывороточным белкам крови человека с нормальной сывороткой крови человека) свидетельствует о возможности использования СО для подтверждения подлинности (видоспецифичности) препаратов иммуноглобулинов человека методом иммуноэлектрофореза и методом иммунодиффузии в агаре.

Выводы

1. Проведена аттестация Стандартного образца тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека ме-

тодом иммуноэлектрофореза (ОСО 42-28-77-2016) в соответствии с современными требованиями.

2. По результатам аттестации установлено, что анти-сыворотка к сывороточным белкам крови человека в реакции иммуноэлектрофореза с нормальной сывороткой крови человека проявляет не менее 15 линий преципитации.

3. Стандартный образец тест-системы для определения фракционного (антигенного) состава препаратов из сыворотки крови человека методом иммуноэлектрофореза целесообразно использовать при исследовании фракционного состава препаратов иммуноглобулинов человека путем визуального сравнения иммуноэлектрофоретических картинок, а также для подтверждения подлинности (видоспецифичности) препаратов иммуноглобулинов человека.

4. Обоснована возможность использования буфера «КлиниТест-ЭФ» при исследовании фракционного состава препаратов иммуноглобулинов человека методом иммуноэлектрофореза.

5. Установлено, что краситель пиронин В может быть использован для оценки миграции белковых фракций сыворотки крови при проведении электрофореза с использованием буфера «КлиниТест-ЭФ» и 0,05 М боратного буферного раствора.

Литература

1. Казаков АС, Затолочина КЭ, Романов БК, Букатина ТМ, Вельц НЮ. Система управления рисками — важная часть Правил надлежущей практики фармаконадзора (GVP). Безопасность и риск фармакотерапии 2016; (1): 21–7.
2. ФС. 3.3.2.0007.15. Иммуноглобулин человека нормальный. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 3. М.; 2015. С. 1239–44. Available from: <http://femb.ru/feml>.
3. ФС. 3.3.2.0008.15. Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 3. М.; 2015. С. 1245–51. Available from: <http://femb.ru/feml>.
4. Human normal immunoglobulin for intravenous administration. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
5. 2.7.1. Immunochemical methods. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
6. Борисевич ИВ, Петухов ВГ, Волкова РА, Устинникова ОБ, Фадейкина ОВ, Малкова ВИ. Стандартные образцы как средство метрологического обеспечения аналитических методов контроля медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП). Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2010; (4): 8–10.
7. Фримель Х, ред. Иммунологические методы. М.: Мир; 1979.
8. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Климов ВИ, Саканян ЕИ, Олещук ЮВ, Меркулов ВА и др. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16(4): 229–36.
9. ОФС. 1.8.2.0002.15. Иммуноэлектрофорез в агаровом геле. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2. М.; 2015. С. 896–901. Available from: <http://femb.ru/feml>.
10. ОФС. 1.2.1.0021.15. Электрофорез. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. М.; 2015. С. 616–21. Available from: <http://femb.ru/feml>.
11. Бондарев ВП, Борисевич ИВ, Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения 2013; (2): 28–32.

Об авторах

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

Корнилова Ольга Геннадьевна. Главный эксперт лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Арефьева Ирина Леонидовна. Ведущий микробиолог лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Коновалова Екатерина Сергеевна. Инженер-лаборант лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Волкова Рауза Асхатовна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р биол. наук.

Фадейкина Ольга Васильевна. Главный технолог Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Кудашева Эльвира Юрьевна. Начальник лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Мовсесянц Арташес Авакович. Начальник Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Корнилова Ольга Геннадьевна; Kornilova@expmed.ru

Certification and potential future use of the reference standard designed for the test system for determination of the fractional (antigenic) composition of human serum products by immunoelectrophoresis

O. G. Kornilova, I. L. Arefyeva, E. S. Konovalova, R. A. Volkova, O. V. Fadeykina, E. Yu. Kudasheva, A. A. Movsesyants

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

The article gives an account of certification performed for a new batch of a Reference standard to be used with the test system for determination of the fractional (antigenic) composition of human serum products by immunoelectrophoresis — industry reference standard (IRS) 42-28-77 — in accordance with existing requirements. A candidate reference standard was represented by a batch of normal human serum intended for diagnostic purposes (more than 500 donors) and a batch of immunoelectrophoresis serum against human serum proteins (antiserum against human serum proteins). In accordance with the certification programme, the fractional (antigenic) composition of the reference standard was determined by immunoelectrophoresis using «KliniTest-EF» buffer and 0.05 M borate buffer solution and the modes stipulated in the general monograph 1.8.2.0002.15 Agar gel immunoelectrophoresis. The reaction between the antiserum against human serum proteins and the normal human serum components of the reference standard produced at least 15 precipitation lines. The study demonstrated that the bromphenol blue dye could be used together with «KliniTest-EF» buffer to assess albumin migration, and the pyronin B dye could be used together with «KliniTest-EF» buffer and 0.05 M borate buffer solution to assess immunoglobulin migration. The study confirmed the applicability of the certified reference standard designed for the test system for determination of the fractional (antigenic) composition of human serum products by immunoelectrophoresis, and set the criteria for its use in the context of human serum products identification (species specificity) testing not only by immunoelectrophoresis, but also by agar-gel immunodiffusion.

Key words: reference standard to be used with the test system for determination of the fractional (antigenic) composition; blood products; human immunoglobulin products; immunoelectrophoresis; immunodiffusion; identification (species specificity); buffer solution; dye.

For citation: Kornilova OG, Arefyeva IL, Konovalova ES, Volkova RA, Fadeykina OV, Kudasheva EYu, Movsesyants AA. Certification and potential future use of the reference standard designed for the test system for determination of the fractional (antigenic) composition of human serum products by immunoelectrophoresis. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(2): 116–121.

References

1. Kazakov AS, Zatolochina KE, Romanov BK, Bukatina TM, Velts NY. The risk management system as the important part of good pharmacovigilance practices (GVP). *Safety and Risk of Pharmacotherapy* 2016; (1): 21–7 (in Russian).
2. ФС. 3.3.2.0007.15. Normal human immunoglobulin. *The State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 13th ed. V. 3. Moscow; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml>.
3. ФС. 3.3.2.0008.15. Normal human immunoglobulin for intravenous administration. *The State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 13th edition. V. 3. Moscow; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml>.
4. Human normal immunoglobulin for intravenous administration. *European Pharmacopoeia* 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
5. 2.7.1. Immunochemical methods. *European Pharmacopoeia* 9.0. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep900>.
6. Borisevich IV, Petukhov VG, Volkova RA, Ustinnikova OB, Fadeykina OV, Malkova VI. Standard samples as a tool to provide metrology of analytical methods of immunobiological medicines (IM) monitoring. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2010; (4): 8–10 (in Russian).
7. Friemel H, ed. *Immunological methods*. Moscow: Mir; 1979 (in Russian).

8. Volkova RA, Fadeykina OV, Klimov VI, Sakanyan EI, Olefir YuV, Merkulov VA, et al. Topical issues related to reference standards in the sphere of circulation of biological products. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(4): 229–36 (in Russian).
9. ОФС. 1.8.2.0002.15. Agarose gel immunoelectrophoresis. *The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th edition. V. 2. Moscow; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml>.*
10. ОФС. 1.2.1.0021.15. Electrophoresis. *The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th edition. V. 1. Moscow; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml>.*
11. Bondarev VP, Borisevich IV, Volkova RA, Fadeykina OV. Industry reference standards certification for the control of medical immunobiological preparations. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2013; (2): 28–32 (in Russian).

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.

Kornilova OG. Chief expert of the Laboratory of Immunoglobulins and Blood Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Arefyeva IL. Senior microbiologist of the Laboratory of Immunoglobulins and Blood Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Kononova ES. Engineering technician of the Laboratory of Immunoglobulins and Blood Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Volkova RA. Head of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Biological Sciences.

Fadeykina OV. Chief technologist of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Kudasheva EY. Head of the Laboratory of Immunoglobulins and Blood Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Movsesyants AA. Head of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Medical Sciences, Professor.

Contact e-mail: Kornilova Olga Gennadyevna; Kornilova@expmed.ru

Аттестация отраслевого стандартного образца специфической активности вакцины полиомиелитной пероральной, двухвалентной, живой аттенуированной 1, 3 типов — БиВак полио

Е. В. Карпова, А. Д. Сангаджиева, Т. В. Мамонтова, О. В. Фадейкина, Р. А. Волкова,
К. А. Саркисян, А. А. Мовсесянц

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

Поступила 28.02.2017 г. Принята к публикации 14.04.2017 г.

Для стандартизации и контроля новой двухвалентной вакцины БиВак полио (вакцина полиомиелитная пероральная, двухвалентная, живая аттенуированная 1, 3 типов), разработанной в Российской Федерации на производстве ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова», необходимо наличие отраслевого стандартного образца (ОСО) для определения регламентированного нормативной документацией содержания инфекционных единиц каждого из двух типов полиовирусов в дозе вакцины. Представлены материалы по аттестации первого отраслевого стандартного образца (ОСО) специфической активности вакцины полиомиелитной пероральной, двухвалентной, живой аттенуированной 1, 3 типов. Проведены испытания по оценке показателей: «Прозрачность», «Цветность», «рН», «Стерильность», «Подлинность», «Специфическая активность», «Термостабильность». Показатели качества «Подлинность», «Специфическая активность», «Термостабильность» оценивали в сравнении с ОСО вакцинного вируса полиомиелита 1 типа (ОСО 42-28-362–2016) и ОСО вакцинного вируса полиомиелита 3 типа (ОСО 42-28-372–2015). Установлена аттестованная характеристика ОСО: для 1 типа — $10^{7,38 \pm 0,38}$ ТЦД₅₀/мл; для 3 типа — $10^{6,7 \pm 0,48}$ ТЦД₅₀/мл и срок годности — 1,5 года. Отраслевому стандартному образцу присвоен номер — ОСО 42-28-434–2016. ОСО может быть использован при испытании специфической активности коммерческих серий БиВак полио.

Ключевые слова: вакцина полиомиелитная пероральная, двухвалентная, живая аттенуированная 1, 3 типов; отраслевой стандартный образец; специфическая активность; референс-препараты; хранение вакцины; культура клеток.

Библиографическое описание: Карпова ЕВ, Сангаджиева АД, Мамонтова ТВ, Фадейкина ОВ, Волкова РА, Саркисян КА, Мовсесянц АА. Аттестация отраслевого стандартного образца специфической активности вакцины полиомиелитной пероральной, двухвалентной, живой аттенуированной 1,3 типов — БиВак полио. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(2): 122–127.

В 1988 г. Ассамблея ВОЗ поставила задачу глобальной ликвидации полиомиелита на земном шаре до 2000 г. В 1996 г. Российская Федерация приступила к выполнению Национальной программы ликвидации полиомиелита, вызванного диким полиовирусом. В качестве инструмента для достижения цели глобальной ликвидации инфекции ВОЗ была рекомендована иммунизация живой оральной полиомиелитной вакциной, которая могла обеспечить не только создание надежной иммунной прослойки и снижение заболеваемости до нулевого уровня среди населения, но и прерывание циркуляции дикого полиовируса [1, 2].

Вместе с тем на заключительном этапе искоренения полиомиелита на первый план вышли две проблемы, связанные с применением живой пероральной полиомиелитной вакцины — это возможность возникновения случаев поставочных осложнений в виде вакциноассоциированного паралитического полиомиелита (ВАПП) и возможность формирования вакцинородственных полиовирусов (ВРПВ).

С полиовирусом типа 2 связано 40 % случаев ВАПП [3].

В мире с 2000 г. зарегистрировано 748 случаев полиомиелита, вызванного ВРПВ. В 2013 г. 7 стран сообщили о случаях полиомиелита, вызванных ВРПВ. Все они были связаны с полиовирусом 2 типа. Так как дикий полиовирус 2 типа был искоренен в 1999 г., случаи полио-

миелита, связанные с вирусом 2 типа, по-видимому, являются результатом продолжающегося использования трехвалентной живой пероральной полиомиелитной вакцины [4].

Для окончательного решения глобальной программы искоренения полиомиелита ВОЗ разработала «Стратегический план ликвидации полиомиелита и осуществления завершающего этапа в 2013–2018 гг.», в соответствии с которым было рекомендовано всем странам отказаться от использования полиовируса 2 типа в трехвалентной живой пероральной полиомиелитной вакцине.

В рамках исполнения решения ВОЗ, в котором рекомендовано всем странам перейти на вакцинацию двухвалентной пероральной полиомиелитной вакциной, в Российской Федерации на производстве ФГУП «ПИПВЭ им. М. П. Чумакова» (ныне — Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН») (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН») была разработана двухвалентная вакцина БиВак полио (вакцина полиомиелитная пероральная, двухвалентная, живая аттенуированная 1, 3 типов).

Стандартизация и контроль новой полиомиелитной вакцины требуют создания и применения в практике ее производства и контроля отраслевых стандартных образ-

цов (ОСО) для определения регламентированного НД содержания инфекционных единиц каждого из двух типов полиовирусов в дозе вакцины. С этой целью на предприятии ФГУП «ПИПВЭ им. М. П. Чумакова» в конце 2013 г. был разработан Производственный стандартный образец (ПСО 0605-02-12) для определения активности вакцины полиомиелитной пероральной 1, 3 типов в культуре клеток Нер-2 (Цинциннати), имеющий следующие характеристики: титр полиовируса 1 типа — $10^{7,46 \pm 0,08}$ ТЦД₅₀/мл; титр полиовируса 3 типа — $10^{6,54 \pm 0,07}$ ТЦД₅₀/мл.

Целью настоящей работы является аттестация ОСО, материалом для которого послужил ПСО 0605-02-12. В основу аттестации были положены рекомендации ВОЗ, опыт разработчиков ОСО вакцины полиомиелитной пероральной 1, 2, 3 типов; ОСО вакцинных вирусов полиомиелита для определения активности полиомиелитных моновакцин, а также опыт сотрудников ГИСК им. Л. А. Тарасевича и ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России по созданию ОСО для стандартизации и контроля других вирусных вакцин [5–10].

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определение показателей качества кандидата в ОСО активности вакцины для профилактики полиомиелита.
2. Установление значения аттестуемой характеристики кандидата в ОСО — специфической активности.
3. Установление срока годности ОСО.

Материалы и методы

Материалы

1. Кандидат в ОСО активности вакцины для профилактики полиомиелита представляет собой смесь аттенуированных штаммов вирусов полиомиелита 1 типа (штамм Sabin LSe 2 ab/kp2), 3 типа (Sabin Leon 12alb/kp 3), полученных на культуре клеток почек африканских зеленых мартышек (КПЗМ).

2. Референс-препараты:

– ОСО вакцинного вируса полиомиелита 1 типа для определения активности моновакцины полиомиелитной пероральной 1 типа в культуре клеток Нер-2 Цинциннати (ОСО 42-28-362–2016).

– ОСО вакцинного вируса полиомиелита 3 типа для определения активности моновакцины полиомиелитной пероральной 3 типа в культуре клеток Нер-2 Цинциннати (ОСО 42-28-372–2015).

3. Культура клеток

Использовали культуру клеток линии Нер-2 (Цинциннати) на уровне от 180 до 191 пассажа.

4. Культуральная среда:

– Среда для культивирования — Игла MEM с L-глутамином (ФГУП «ПИПВЭ им. М. П. Чумакова») с добавлением 40 мкг/мл антибиотика гентамицина сульфата, 5 % сыворотки эмбриональной телячьей (производства Life technologies).

– Среда для разведения — Игла MEM с L-глутамином (ФГУП «ПИПВЭ им. М. П. Чумакова»), с добавлением 40 мкг/мл антибиотика гентамицина сульфата, 2 % сыворотки эмбриональной телячьей (производства Life technologies).

5. Сыворотки диагностические:

– Сыворотки диагностические энтеровирусные моновалентные сухие для реакции нейтрализации 1 тип, производства ФГУП «ПИПВЭ им. М. П. Чумакова»;

– Сыворотки диагностические энтеровирусные моновалентные сухие для реакции нейтрализации 3 тип, производства ФГУП «ПИПВЭ им. М. П. Чумакова».

Методы

Испытания кандидата в ОСО по показателям: «Прозрачность», «Цветность», «рН», «Стерильность», «Подлинность», «Специфическая активность», «Термостабильность» проводили по методикам, изложенным в нормативной документации ЛП-003511-180316 на БиВак полио (вакцина полиомиелитная пероральная, двухвалентная, живая аттенуированная 1, 3 типов) [11].

Показатели «Подлинность», «Специфическая активность», «Термостабильность» определяли методом микротитрования в планшетах для культуры клеток по цитопатогенному действию [11, 12].

Принцип метода. В основе метода микротитрования лежит реакция нейтрализации вируса сыворотками диагностическими энтеровирусными моновалентными сухими для реакции нейтрализации 1 и 3 типов. Рост клеток Нер-2 (Цинциннати) зависит от полноты нейтрализации. Специфическую активность оценивали по цитопатогенному действию и выражали в тканевых цитопатогенных инфекционных дозах (ТЦД₅₀) [11, 12].

Подготовка образцов кандидата в ОСО и референс-препарата для определения показателя «Термостабильность». Для каждого титрования отбирали по 3 образца кандидата в ОСО и один образец референс-препарата. Прогревали при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. Далее содержимое трех образцов кандидата в ОСО объединяли в один, перемешивали и готовили разведения испытуемого образца (кандидата в ОСО). Готовили разведения референс-препарата и контрольных образцов. Контрольными образцами являются образцы, не подвергшиеся прогреванию [11, 12].

Подготовка образцов кандидата в ОСО для определения показателя «Специфическая активность». Для каждого титрования отбирали по три образца кандидата в ОСО, объединяли в один, тщательно перемешивали и готовили разведения испытуемого образца на среде Игла MEM, содержащей 2 % эмбриональной сыворотки [11, 12].

Статистические методы

– Учитывали результаты только тех титрований, в которых значения титров, одновременно титруемых с ОСО референс-препаратов, не отличаются от среднего значения титров, указанных в паспорте: ОСО вакцинного вируса полиомиелита 1 типа — $8,01 \pm 0,36$ lg; ОСО вакцинного вируса полиомиелита 3 типа — $7,36 \pm 0,22$ lg;

– обработку результатов титрования проводили по методу Рида и Менча;

– статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel с вычислением среднего значения, стандартного отклонения, ошибки средней, 95 % доверительного интервала, оценку достоверности различий проводили по критерию Стьюдента, который рассчитывали по формуле

$$t = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}, \quad (1)$$

где X_1 и X_2 — среднее арифметическое для активности вируса полиомиелита типа 1 и типа 3 соответственно; m_1 и

m_2 — ошибка среднего арифметического для X_1 и X_2 , рассчитанная по формуле [13]:

$$m = \frac{s}{\sqrt{n}}, \quad (2)$$

где S — среднее квадратическое отклонение; n — число испытаний.

Результаты и обсуждение

Показатели качества кандидата в ОСО оценивали по НД на БиВак полио (Вакцина полиомиелитная пероральная, двухвалентная, живая аттенуированная 1, 3 типов) ЛП-003511-180316 [11].

Показатели «Прозрачность», «Цветность» оценивали визуально. ОСО представляет собой прозрачную жидкость розово-малинового цвета.

Определение pH проводили потенциометрическим методом. pH составляет 6,8.

Стерильность оценивали методом прямого посева — препарат стерилен.

Подтверждение подлинности кандидата в ОСО проводили с использованием смеси сывороток диагностических энтеровирусных моновалентных сухих для реакции нейтрализации 1 и 3 типов. Испытание образцов проводили в трех повторях.

Титр вируса в присутствии смеси сывороток диагностических энтеровирусных моновалентных сухих 1, 3 типов снижался более чем на 2 lg в сравнении с титром вируса без добавления сывороток, что подтверждает подлинность образцов.

Таблица 1. Результаты титрования кандидата в ОСО по показателю «Термостабильность»

Титр кандидата в ОСО — контрольные образцы, lg ТЦД ₅₀ /мл	Титр кандидата в ОСО после прогрева образцов, lg ТЦД ₅₀ /мл	Разница значений, lg ТЦД ₅₀ /мл
7,8	7,5	0,3
7,8	7,4	0,4
7,1	7,3	0,2

Испытания образцов по показателю «Термостабильность» также проводили в трех повторях. Результаты представлены в таблице 1.

Как видно из данных, представленных в таблице 1, разница значений титров контрольных образцов ПСО и образцов после прогрева колеблется от 0,2 до 0,4 lg. Титр вируса не снижался более чем на 0,5 lg после прогрева при (37±1) °С в течение 48 ч по сравнению с контрольными образцами, что свидетельствует о термостабильности образцов.

Таким образом, качество кандидата в ОСО по показателям: «Прозрачность», «Цветность», «pH», «Стерильность», «Подлинность», «Термостабильность» соответствует требованиям НД на вакцину БиВак полио [11].

Установление значения аттестуемой характеристики кандидата в ОСО проводили двумя операторами. Аттестуемой характеристикой в данной работе является специфическая активность, которую оценивали по специфической активности на одном и разных пассажах культуры клеток Нер-2 (Цинциннати).

Испытание образцов на одном пассаже клеток проводили в девяти повторях параллельно с референс-препаратами. Для испытания использовали клетки с уровнем пассажа 180. Результаты представлены в таблице 2.

Значения t -критерия Стьюдента, вычисленные по результатам определения активности вирусов полиомиелита 1 типа ($t_{\text{эксп.тип1}}$) и 3 типа ($t_{\text{эксп.тип3}}$) двумя операторами на одном пассаже клеточной культуры, составили $t_{\text{эксп.тип1}} = 0,59$ и $t_{\text{эксп.тип3}} = 0,14$ соответственно. Полученные значения меньше, чем критическое значение $t_{\text{табл}}$, равное 2,37 (при уровне значимости $\alpha = 0,05$ и числе степеней свободы $f = 7$), что свидетельствует о том, что различия результатов определения активности вакцинного вируса полиомиелита типа 1 и типа 3, полученные разными операторами на одном пассаже культуры клеток Нер-2 (Цинциннати), статистически не значимы.

Специфическая активность кандидата в ОСО на разных пассажах культуры клеток Нер-2 (Цинциннати) была проведена одним оператором. Для испытания использовали клетки Нер-2 (Цинциннати) с уровнем пассажа от 188 до 191.

Испытание образцов проводили в одиннадцати повторях также параллельно с референс-препаратами: ОСО вакцинного вируса полиомиелита 1 типа и ОСО вакцинного вируса полиомиелита 3 типа.

Таблица 2. Результаты титрования кандидата в ОСО и референс-препаратов по показателю «Специфическая активность» на одном пассаже культуры клеток

Оператор	Характеристика	Кандидат в ОСО		Референс-препарат 1 тип	Референс-препарат 3 тип
		1 тип	3 тип		
№ 1 $n = 5$	X_{cp} (lg ТЦД ₅₀ /мл)	7,48	6,96	7,85	7,52
	S (lg ТЦД ₅₀ /мл)	0,25	0,09	0,15	0,13
	$2S$ (lg ТЦД ₅₀ /мл)	0,50	0,18	0,30	0,26
	m_1 (lg ТЦД ₅₀ /мл)	0,11	0,04	—	—
№ 2 $n = 4$	X_{cp} (lg ТЦД ₅₀ /мл)	7,38	6,98	7,79	7,27
	S (lg ТЦД ₅₀ /мл)	0,26	0,26	0,23	0,09
	$2S$ (lg ТЦД ₅₀ /мл)	0,52	0,52	0,46	0,18
	m_2 (lg ТЦД ₅₀ /мл)	0,13	0,13	—	—

X_{cp} — средние арифметические для активности вирусов полиомиелита; S — среднее квадратическое отклонение; m_1 и m_2 — ошибка среднего арифметического для X_{cp} ; n — число испытаний.

Таблица 3. Результаты определения активности кандидата в ОСО на одном и разных пассажах культуры клеток Нер-2 (Цинциннати)

Характеристика	Активность кандидата в ОСО на одном пассаже клеток двумя операторами		Активность кандидата в ОСО на разных пассажах клеток одним оператором	
	1 тип	3 тип	1 тип	3 тип
X_{cp} (lg ТЦД ₅₀ /мл)	7,43	6,97	7,28	6,82
S (lg ТЦД ₅₀ /мл)	0,25	0,17	0,19	0,16
m (lg ТЦД ₅₀ /мл)	0,08	0,06	0,06	0,05
n	9	9	11	11

X_{cp} — средние арифметические для активности вируса полиомиелита; S — среднее квадратическое отклонение; m — ошибка среднего арифметического для X_{cp} ; n — число испытаний.

Таблица 4. Результаты оценки аттестуемого значения специфической активности кандидата в ОСО

Характеристика	Значение аттестуемой характеристики ОСО (lg ТЦД ₅₀ /мл)	
	1 тип	3 тип
На одном пассаже клеток	7,48	6,96
	7,38	6,98
На разных пассажах клеток	7,28	6,82
Данные предприятия	7,40	6,50
X_{cp}	7,38	6,7
S	0,19	0,24
$2S$	0,38	0,48

Данные титрования по показателю «Специфическая активность» на разных пассажах культуры клеток Нер-2 (Цинциннати), а также обобщенные результаты испытаний на одном пассаже представлены в таблице 3.

Значения t -критерия Стьюдента, вычисленные по экспериментальным данным для активности вирусов полиомиелита 1 типа ($t_{\text{эксп.тип1}}$) и 3 типа ($t_{\text{эксп.тип3}}$) на одном пассаже и на разных пассажах клеточной культуры, составило $t_{\text{эксп.тип1}} = 1,2$ и $t_{\text{эксп.тип3}} = 1,8$ соответственно. Полученные значения меньше, чем критическое значение $t_{\text{табл}}$, равное 2,101 (при уровне значимости $\alpha = 0,05$ и числе степеней свободы $f = 18$). Следовательно, различия между данными по активности вакцинного вируса полиомиелита типа 1 и типа 3, полученные как на одном пассаже, так и на разных пассажах клеточных культур Нер-2 (Цинциннати), статистически не значимы.

Кандидат в ОСО специфической активности вакцины БиВак полио был разработан и аттестован как производственный стандартный образец в ФГУП ПИПВЭ им. М. П. Чумакова в 2013 г. Анализ представленных разработчиком данных за 2015 г. показал отсутствие снижения титра вирусов полиомиелита в реальном времени (титр вируса полиомиелита 1 типа находился в пределах от 7,35 до 7,49 lg; титр вируса полиомиелита 3 типа — от 6,41 до 6,58 lg), что свидетельствует о стабильности препарата.

Для расчета специфической активности кандидата в ОСО использовали весь массив экспериментальных данных. Полученные результаты оценки аттестуемой характе-

ристикой — специфической активности кандидата в ОСО представлены в таблице 4.

Стандартное отклонение составило для 1 типа — 0,19, для 3 типа — 0,24. Два стандартных отклонения — 0,38 и 0,48 соответственно. Таким образом, значения аттестованных характеристик кандидата в ОСО для 1 типа — $10^{7,38 \pm 0,38}$ ТЦД₅₀/мл; для 3 типа — $10^{6,7 \pm 0,48}$ ТЦД₅₀/мл.

С учетом режима хранения вакцины БиВак полио — 2 года при температуре минус 20 °С и ниже, вновь разработанным отраслевым стандартному образцу специфической активности БиВак полио установлен срок годности 1,5 года с последующей переаттестацией и продлением срока его годности.

Выводы

На основании представленных данных можно сделать вывод о соответствии изучаемого кандидата в ОСО требованиям, предъявляемым к стандартным образцам вакцин. Значения аттестованных характеристик кандидата в ОСО составляют: для 1 типа — $10^{7,38 \pm 0,38}$ ТЦД₅₀/мл; для 3 типа — $10^{6,7 \pm 0,48}$ ТЦД₅₀/мл.

Стандартному образцу присвоен номер ОСО 42-28-434–2016. ОСО может быть использован при испытании специфической активности коммерческих серий БиВак полио (вакцины полиомиелитной пероральной, двухвалентной, живой аттенуированной 1, 3 типов).

Литература

- Семенов БФ. Глобальное искоренение полиомиелита и кори: проблемы и решения. *Вакцинация* 2001; 1(13): 2–3.
- Marx A, Glass JD, Sutter RW. Differential diagnosis of acute flaccid paralysis and its role in poliomyelitis surveillance. *Epidemiol Rev.* 2000; 22(2): 298–316.
- Strebel PM, Sutter RW, Cochi SL, Biellik RJ, Brink EW, Kew OM, et al. Epidemiology of poliomyelitis in the United States one decade after the last reported case of indigenous wild virus-associated disease. *Clin Infect Dis.* 1992; 14(2): 568–79.
- Онищенко ГГ, Дроздов СГ, Лялина ЛВ, Бичурина МА, Грачев ВП, Иванова ОЕ и др. Проблемы ликвидации полиомиелита. Санкт-Петербург: НИИЭМ им. Пастера; 2008.
- WHO Expert Committee on biological standardization. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. *WHO Technical Report Series* 932, annex 2. Geneva: 2004: 73–131, 137.
- Волкова РА, Фадейкина ОВ, Мовсесянц АА, Борисевич ИВ. Опыт Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича по разработке и аттестации медицинских иммунобиологических препаратов. *Стандартные образцы* 2011; (4): 17–21.
- Бондарев ВП, Борисевич ИВ, Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения* 2013; (2): 28–32.
- Волкова РА, Фадейкина ОВ, Борисевич ИВ, Мовсесянц АА, Бондарев ВП. Оценка состояния проблемы аттестации и применения отраслевых стандартных образцов медицинских иммунобиологических препаратов. *Стандартные образцы* 2013; (3): 58–61.
- Мухачева АВ, Перекрест ВВ, Мовсесянц АА, Саркисян КА, Бутырский АЮ, Фадейкина ОВ и др. Результаты переаттестации отраслевого стандартного образца и использования его при экспертизе качества вакцин против натуральной оспы. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика* 2016; 6(91): 70–9.
- Юнасова ТН, Шитикова ОЮ, Фадейкина ОВ, Ильясова ТН, Устинникова ОБ, Волкова РА и др. Аттестация новой серии

отраслевого стандартного образца активности живой ко- ревой вакцины. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2014; (3): 40–5.

11. Нормативная документация на «БиВак полио» (Вакцина полиомиелитная пероральная, двухвалентная, живая аттенуированная 1, 3 типов) ЛП-003511–180316.

12. ФС 3.3.1.0037.15. Вакцина полиомиелитная пероральная 1, 2, 3 типов, раствор для приема внутрь. Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 3. М.; 2015. С. 1110–25. Available from: <http://femb.ru/feml>.

13. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999.

Об авторах

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

Карпова Елена Викторовна. Главный эксперт лаборатории вирусных вакцин Испытательного Центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Сангаджиева Анна Джангировна. Эксперт 2 категории лаборатории вирусных вакцин Испытательного Центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Мамонтова Татьяна Владимировна. Ведущий эксперт лаборатории вирусных вакцин Испытательного Центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Фадейкина Ольга Васильевна. Главный технолог Испытательного Центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Волкова Рауза Асхатовна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного Центра экспертизы качества МИБП, д-р биол. наук.

Саркисян Каринэ Арташесовна. Начальник лаборатории вирусных вакцин Испытательного Центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Мовсесянц Арташес Авакович. Начальник Испытательного Центра экспертизы качества МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Карпова Елена Викторовна; karpova@expmed.ru

Certification of the industry reference standard for the specific activity of «BiVac polio» — live attenuated bivalent oral polio vaccine type 1 and 3

E. V. Karpova, A. D. Sangadzhieva, T. V. Mamontova, O. V. Fadeykina, R. A. Volkova, K. A. Sarkisyan, A. A. Movsesyants

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

The standardization and control of «BiVac polio» (live attenuated bivalent oral polio vaccine type 1 and 3) developed by M. P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis of the Russian Academy of Medical Sciences, called for establishment of an industry reference standard (IRS) to be used in determination of infectious units for each type of the poliovirus in a vaccine dose, according to the requirements of the quality standard. The article gives an account of certification performed for the first batch of a live attenuated bivalent oral polio vaccine type 1 and 3 IRS. The following parameters were tested: Clarity, Colourity, pH, Sterility, Identification, Specific activity, Thermal stability. Identification, Specific activity and Thermal stability of the candidate reference standard were assessed in comparison with the vaccine poliovirus type 1 IRS (IRS 42-28-362–2016) and vaccine poliovirus type 3 IRS (IRS 42-28-372–2015). The IRS certified parameter was found to be: $10^{7.38 \pm 0.38}$ TCID₅₀/ml for type 1 and $10^{6.7 \pm 0.48}$ TCID₅₀/ml for type 3. The IRS was assigned with the number IRS 42-28-434–2016 and a shelf life of 1.5 years. The IRS can be used in specific activity testing of «BiVac polio» commercial batches.

Key words: live attenuated bivalent oral polio vaccine type 1 and 3; industry reference standard; specific activity; reference medicines; vaccine storage; cell culture.

For citation: Karpova EV, Sangadzhieva AD, Mamontova TV, Fadeykina OV, Volkova RA, Sarkisyan KA, Movsesyants AA. Certification of the industry reference standard for the specific activity of «BiVac polio» — live attenuated bivalent oral polio vaccine type 1 and 3. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(2): 122–127.

References

1. Semenov BF. Global eradication of poliomyelitis and measles: problems and solutions. *Vaccination* 2001; 1(13): 2–3 (in Russian).
2. Marx A, Glass JD, Sutter RW. Differential diagnosis of acute flaccid paralysis and its role in poliomyelitis surveillance. *Epidemiol. Rev.* 2000; 22(2): 298–316.
3. Strebel PM, Sutter RW, Cochi SL, Biellik RJ, Brink EW, Kew OM, et al. Epidemiology of poliomyelitis in the United States one decade after the last reported case of indigenous wild virus-associated disease. *Clin Infect Dis.* 1992; 14(2): 568–79.
4. Onishchenko GG, Drozdov SG, Lyalina LV, Bichurina MA, Grachev VP, Ivanova OE. The problems of polio eradication. Saint Petersburg: Institute Pasteur; 2008 (in Russian).
5. WHO Expert Committee on biological standardization. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. WHO Technical Report Series 932, annex 2. Geneva: 2004: 73–131, 137.

6. Volkova RA, Fadeykina OV, Movsesyants AA, Borisevich IV. The experience of L. A. Tarasevich State Scientific Research Institute for Standardization and Control of Medical and Biological Products in the development and certification of certified reference materials of medical immunobiological products. *Reference Materials* 2011; (4): 17–21 (in Russian).
7. Bondarev VP, Borisevich IV, Volkova RA, Fadeykina OV. Industry reference standards certification for the control of medical immunobiological preparations. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2013; (2): 28–32 (in Russian).
8. Volkova RA, Fadeykina OV, Borisevich IV, Movsesyants AA, Bondarev VP. Assessment of the current state of certification and use of branch reference materials of medical immunobiological preparations. *Reference Materials* 2013; (3): 58–61 (in Russian).
9. Muhacheva AV, Perekrst VV, Movsesyants AA, Sarkisyan KA, Butyrskiy AU, Fadeykina OV, et al. The Results of Re-certification of Reference Standard Sample Used for the Examination of Quality Smallpox Vaccines. *Epidemiology and vaccinal prevention* 2016; 6(91): 70–9 (in Russian).
10. Yunasova TN, Shitikova OYu, Fadeykina OV, Sidorenko ES, Sukhanova LL, Ilyasova TN, et al. Evaluation of a new series of branch reference standard of live measles vaccine activity. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2014; (3): 40–5 (in Russian).
11. LP-003511–180316. Vaccine poliomyelitis oral, bivalent, live attenuated 1, 3 types (in Russian).
12. ФС 3.3.1.0037.15. The oral polio vaccine 1, 2, 3 types, a solution for intake. *The State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 13th edition. V. 3. Moscow; 2015. P. 1110–25. Available from: <http://femb.ru/feml> (in Russian).
13. Glantz SA. *Primer of Biostatistics*. Moscow: Praktika; 1999 (in Russian).

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.

Karpova EV. Chief expert of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Sangadgieva AD. 2nd professional category expert of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Mamontova TV. Leading expert of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Volkova RA. Head of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Biological Sciences.

Fadeykina OV. Chief technologist of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Sarkisyan KA. Head of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Movsesyants AA. Head of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Medical Sciences, Professor.

Contact e-mail: Karpova Elena Viktorovna; karpova@expmed.ru

V Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы профилактики, диагностики и лечения туберкулеза у детей и подростков» совместно с заседанием профильной комиссии Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности «Фтизиатрия» при главном внештатном детском специалисте фтизиатре

23–25 марта 2017 года в Казани состоялась V Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы профилактики, диагностики и лечения туберкулеза у детей и подростков» совместно с заседанием профильной комиссии Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности «Фтизиатрия» при главном внештатном детском специалисте фтизиатре. Организаторами конференции выступили Министерство здравоохранения Российской Федерации, НИИ фтизиопульмонологии ФГАУ ВО Первого МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, Российское общество фтизиатров, Министерство здравоохранения Республики Татарстан.

За последние годы в Российской Федерации удалось не только остановить распространение туберкулезной инфекции, но и придать существенный импульс темпам снижения заболеваемости и смертности от туберкулеза. Основными мероприятиями по снижению этих показателей является профилактика и раннее выявление туберкулеза у детей и подростков. Актуальность проведения конференции обусловлена необходимостью повышения качества лечебно-диагностической помощи детям и подросткам.

В работе конференции приняли участие 827 человек, в числе которых были гости со всех концов Российской Федерации, а также из зарубежных стран (Узбекистана, Таджикистана, Казахстана, Белоруссии). Это специалисты в области педиатрии, фтизиатрии, инфекционных болезней, эпидемиологии, микробиологии, клинической иммунологии и фармакологии, лабораторной диагностики, специалисты Роспотребнадзора.

Конференция проводилась по нескольким научно-практическим направлениям, среди которых: иммунодиагностика туберкулезной инфекции в свете последних нормативно-правовых документов; комбинированные противотуберкулезные препараты в профилактике и лечении различных проявлений туберкулезной инфекции у детей; неспецифические заболевания легких у детей; вакцинопрофилактика детских инфекций у детей из групп риска по заболеванию туберкулезом; повышение качества противотуберкулезных мероприятий у детей и подростков с использованием инновационных препаратов и технологий; проблемы оказания противотуберкулезной помощи детям из очагов туберкулезной инфекции; соблюдение прав ребенка и организация профилактики туберкулеза, отчеты главных внештатных детских специалистов фтизиатров федеральных округов.

Перед началом работы конференции лучшим специалистам фтизиопедиатам была объявлена благодарность за личный вклад в развитие детской фтизиатрии и вручены почетные грамоты.

От имени Министерства здравоохранения Российской Федерации выступила начальник отдела организации медицинской помощи при социально значимых инфекционных заболеваниях Гульшина В. А., которая зачитала приветственное слово заместителя Министра здравоохранения РФ Яковлевой Т. В. к участникам конференции, а также доложила о всесторонней поддержке Минздравом России проблем детского туберкулеза. В работе конференции принял участие и выступил с приветственным словом Министр здравоохранения Республики Татарстан Вафин А. Ю.

Научная программа конференции началась с доклада главного внештатного специалиста фтизиатра Минздрава России, директора НИИ фтизиопульмонологии ФГАУ ВО Первого МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, проф. Васильевой И. А. «Стратегия развития противотуберкулезной службы Российской

Федерации на период до 2020 года. Приоритетные научные направления».

Основные приоритеты противотуберкулезной помощи детям были конкретизированы и развиты в докладе главного внештатного детского специалиста фтизиатра Минздрава России, председателя профильной комиссии, заведующей отделом туберкулеза у детей и подростков НИИ фтизиопульмонологии, проф. Аксеновой В. А. «Туберкулез у детей в России: состояние и приоритеты противотуберкулезной помощи». Аксенова В. А. отметила, что сегодня необходимо развивать профилактическое направление, основанное на современных инновационных технологиях.

В рамках работы конференции были прочитаны лекции «Туберкулез у детей раннего возраста» (профессор Чугаев В. П.), «Возможности системной семейной психотерапии в консультировании детей и подростков из групп риска по заболеванию туберкулезом» (психолог Ломакина О. Б.).

На пленарных заседаниях, которые проходили 2 дня, были представлены 15 научных докладов, в которых приоритетное внимание было уделено стратегии развития противотуберкулезной помощи. Использование достижений науки в практике борьбы с туберкулезом дает свои положительные результаты. Примером может служить внедрение в практику для массового скрининга с целью отбора контингентов в группы диспансерного учета препарата аллергена туберкулезного рекомбинантного (Диаскинест®). Число детей, подлежащих обследованию на туберкулез и подлежащих превентивной химиотерапии, небезразлично для организма ребенка, сократилось в разы, а показатель заболеваемости снизился.

Плодотворно прошли заседания рабочей группы и профильной комиссии при главном внештатном детском специалисте фтизиатре Минздрава России. На рабочей группе обсудили план написания клинических рекомендаций для электронного рубрикатора Минздрава, были одобрены клинические рекомендации «Выявление туберкулеза у детей, поступающих и обучающихся в образовательных учреждениях». На заседании профильной комиссии данные Федеральные клинические рекомендации утверждены. Также на заседании профильной комиссии обсудили новый Порядок по проф. осмотрам населения на туберкулез, были заслушаны отчеты главных внештатных детских специалистов фтизиатров Федеральных округов Российской Федерации. Очередное заседание рабочей группы запланировано на июнь 2017 г.

По традиции на конференции были проведены образовательные школы для практикующих врачей, в которых прошли обучение 430 человек. В последний день конференции прошли мастер-классы, организованные в лечебных учреждениях г. Казани. Участники конференции ознакомились с организацией работы в отделении фтизиатрического скрининга в условиях детской поликлиники г. Казани (детская поликлиника «Азино» ГАУЗ «ДРКБ МЗ РТ»), с организацией выявления туберкулеза в условиях многопрофильного детского стационара (ГАУЗ «ДРКБ МЗ РТ»), посетили детский хоспис, созданный в Казани 14 лет назад общественным благотворительным фондом имени Анжели Вавиловой.

В рамках конференции была проведена выставка, на которой участники могли получить информацию о медицинских препаратах непосредственно от производителя.

Материалы конференции доступны на сайте Российского общества фтизиатров <http://roftb.ru/conf/con27>.

*Председатель оргкомитета
Главный внештатный детский специалист фтизиатр Минздрава России,
председатель профильной комиссии, зав. отделом туберкулеза у детей и подростков
НИИ ФП ПМГМУ им. И. М. Сеченова
д-р мед. наук, профессор В. А. Аксенова*



ВЛАДИМИР ИВАНОВИЧ КЛИМОВ (к 65-летию со дня рождения)

VLADIMIR IVANOVICH KLIMOV (on the 65th anniversary)

6 июня 2017 года исполнилось 65 лет со дня рождения кандидата медицинских наук, старшего научного сотрудника, заместителя директора Центра планирования и координации научно-исследовательских работ Владимира Ивановича Климова.

В. И. Климов родился в 1952 г. в городе Саратове. Окончил в 1975 году Военно-медицинский факультет при Саратовском медицинском институте и был направлен в научно-исследовательский центр (г. Екатеринбург) Института микробиологии Министерства обороны Российской Федерации на должность младшего научного сотрудника.

Работал в указанной организации в должности младшего научного сотрудника, а затем старшего научного сотрудника до 1986 года.

Основные направления работы были связаны с созданием и аттестацией различных защитных препаратов.

С 1987 по 1998 гг. работал в должности начальника научно-исследовательского отдела контроля качества и стандартизации биологических препаратов в Научно-исследовательском институте микробиологии Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров). За указанный период при непосредственном участии В. И. Климова было разработано, поставлено на производство и аттестовано Национальным органом контроля (ГИСК им Л. А. Тарасевича) более 10 препаратов, предназначенных для иммунизации, диагностики и лечения особо опасных инфекционных заболеваний. В 1989 г. В. И. Климову было присвоено звание «полковник медицинской службы».

Основные направления исследований В. И. Климова были связаны с разработкой системы контроля и оценки качества биологических препаратов.

В 1997 году приказом Министра обороны Российской Федерации был переведен в Центральный аппарат Министерства обороны на должность заместителя начальника отдела управления биологической защиты УНВ войск РХБЗ ВС РФ.

Лично и в соавторстве опубликовал более 140 научных трудов.

С начала своей служебной и научной деятельности В. И. Климов осуществлял работу по созданию средств индикации, идентификации, профилактики и лечения особо опасных инфекционных заболеваний. При его участии были разработаны новые высокоэффективные технологии получения защитных препаратов. В. И. Климов — лауреат премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники 1998 года за работу «Высокоэффективная ресурсосберегающая и экологически чистая технология серийного производства живой сухой сибиреязвенной вакцины для людей».

В течение 7 лет (с 1998 по 2005) В. И. Климов являлся ученым секретарем специального экспертного совета Высшей аттестационной комиссии Российской Федерации.

В период с 2005 по 2012 г. работал на должностях старшего научного сотрудника, заместителя начальника отдела, заместителя начальника управления в ГНЦ РФ ФГУП «ЦНИИХМ им. Д. И. Менделеева» ФС ТЭК России.

В 2012 году В. И. Климов поступил на работу в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России на должность главного эксперта лаборатории бактериальных вакцин Испытательного центра экспертизы качества иммунобиологических препаратов. С 2013 года и по настоящее время является заместителем директора Центра планирования и координации научно-исследовательских работ.

В. И. Климов — ответственный секретарь журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

За значительный вклад в дело защиты Отечества и особо выдающиеся заслуги перед государством по защите населения и личного состава Вооруженных Сил Российской Федерации Владимир Иванович Климов награжден орденом Почета.



ДМИТРИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ ШВЕДОВ (к 50-летию со дня рождения)

DMITRIY VLADIMIROVICH SHVEDOV (on the 50th anniversary)

27 июня 2017 года исполнилось 50 лет со дня рождения кандидата медицинских наук, заместителя начальника Испытательного центра экспертизы качества иммунобиологических препаратов Дмитрия Владимировича Шведова.

Д. В. Шведов родился в 1967 г. в Минске. В 1984 г. поступил в Минский государственный медицинский институт на санитарно-гигиенический факультет. В 1985 г. призван в ВС СССР. После прохождения срочной службы в 1987 г. продолжил обучение в медицинском институте. После 4-го курса института для дальнейшего обучения был переведен на Военно-медицинский факультет при Горьковском мединституте, который окончил в 1992 г. по специальности «Санитария».

С 1992 по 1997 гг. проходил военную службу на должностях врача-эпидемиолога бригады, эпидемиолога корпуса, старшего врача-специалиста санитарно-эпидемиологического отряда.

В 1999 году с отличием окончил Военно-медицинскую академию им. С. М. Кирова, факультет руководящего медицинского состава. Квалификация: врач-эпидемиолог, специалист в области управления по специальности «Военное и административное управление».

С 1999 по 2011 гг. служил на различных офицерских должностях санитарно-эпидемиологической службы ВС РФ от заместителя начальника санитарно-эпидемиологического отряда гарнизона, начальника санитарно-эпидемиологического отряда гарнизона до начальника эпидемиологического отдела Центра государственного санитарно-эпидемиологического надзора округа, от начальника эпидемиологического отделения (особо опасных и природно-очаговых инфекций) Главного центра государственного санитарно-эпидемиологического надзора

Министерства обороны РФ до заместителя начальника Главного центра государственного санитарно-эпидемиологического надзора МО РФ.

С сентября 1999 г. по март 2000 г. принимал участие в контртеррористической операции в Чеченской Республике.

В 2005 г. в составе 183 медицинского отряда специального назначения Приволжско-Уральского военного округа участвовал в ликвидации последствий стихийного бедствия в Республике Индонезия.

В августе – сентябре 2005 года, в период возникновения массовых заболеваний холеры и других острых кишечных инфекций среди местного населения Республики Таджикистан организовывал и проводил комплекс противоэпидемических мероприятий по недопущению заноса, возникновения и распространения острых кишечных инфекций.

В период с сентября по декабрь 2006 г. в должности начальника медицинской службы принимал участие в оказании помощи Ливанской Республике, пострадавшей в результате военных действий.

После окончания военной службы с 2011 г. — заместитель начальника Испытательного центра экспертизы качества иммунобиологических препаратов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Д. В. Шведов лично и в соавторстве опубликовал более 40 научных статей.

Ветеран боевых действий. Награжден орденом «За заслуги перед Отечеством» II степени, орденом Ливанской Республики «Надежда Ливана», медалью «За воинскую доблесть» I степени и другими, имеет знак отличия «За заслуги перед ПУРВО».

