

## ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

|  |  |
|--|--|
| Туберкулин очищенный (ППД)<br>(аллерген туберкулезный очищенный) | ФС.3.3.1.0023.15<br>Взамен ГФ X, ст. 705,<br>ФС 42-3302-96,<br>ФС 42-3303-96 |
|--|--|

---

Настоящая фармакопейная статья распространяется на туберкулин очищенный (аллерген туберкулезный очищенный), который представляет собой очищенный туберкулопротеин ППД (PPD – *purified protein derivative*), полученный из инактивированных нагреванием фильтратов культур микобактерий туберкулеза (МБТ) человеческого и бычьего типов, очищенных ультрафильтрацией или другим адекватным методом от бактериальных клеток, с последующим осаждением трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Внутривенное введение туберкулина (проба Манту) выявляет наличие гиперчувствительности замедленного типа, которая является следствием сенсибилизации организма при вакцинации БЦЖ или заражении микобактериями туберкулеза. Препарат предназначен для диагностики туберкулеза, определения инфицированности населения микобактериями туберкулеза и отбора контингентов для вакцинации и ревакцинации против туберкулеза.

### ПРОИЗВОДСТВО

Работа с микобактериями должна проводиться в помещениях, оборудованных автономной приточно-вытяжной вентиляцией, изолированных от помещений, где наличие микобактерий не допускается. Питательные среды перед посевом микобактерий должны быть проверены на стерильность. Выросшие на поверхности жидкой синтетической среды в виде

складчатых пленок культуры микобактерий инактивируют автоклавированием при температуре 121 °С в течение не менее 30 мин или текучим паром при температуре 100 °С в течение 1 ч, фильтруют и концентрируют ультрафильтрацией.

Осаждение туберкулопротеина проводят 50 % раствором ТХУ; осадок отмывают убывающими концентрациями ТХУ, обрабатывают спиртом и эфиром, сушат, проверяют на стерильность и подлинность. После получения положительных результатов сводят в единую серию порошка-полуфабриката (субстанцию). Последующее сведение таких серий в единую серию субстанции является одним из методов получения стандартного препарата длительного срока хранения (20 и более лет). Субстанцию используют для производства туберкулина очищенного в стандартном разведении (2 ТЕ в 0,1 мл), предназначенного для массовой туберкулинодиагностики, или туберкулина очищенного, лиофилизата, предназначенного для индивидуальной туберкулинодиагностики (в ампуле 50000 ТЕ).

Предварительно серию субстанции тестируют на стерильность, отсутствие сенсibiliзирующих свойств, специфическую безопасность (отсутствие живых микобактерий туберкулеза), специфическую активность – определение дозы-навески, содержащей 50000 ТЕ. Специфическую активность туберкулинов выражают в туберкулиновых единицах (ТЕ), эквивалентных международным туберкулиновым единицам (ТУ).

Емкость со смесью порошков (субстанцией) хранят в эксикаторе в темном сухом месте. Каждые 5 лет субстанция подлежит повторному испытанию на стерильность и специфическую активность на животных (подтверждение дозы-навески).

## ИСПЫТАНИЯ СУБСТАНЦИИ

**Стерильность.** Субстанция должна быть стерильной. Субстанцию растворяют в 0,9 % растворе натрия хлорида из расчета 1 мг в 1 мл. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

**Содержание белка.** Должно быть не ниже 75 %. Определение проводят колориметрическим методом в соответствии с ОФС «Определение общего азота с реактивом Нesslerа в иммунобиологических лекарственных препаратах».

### **Специфическая активность**

*Установление дозы-навески субстанции ППД, содержащей 50000 ТЕ.*  
Определение проводят на 18 сенсibilизированных морских свинок путем сопоставления активности разведений навесок порошка (субстанции) с активностью стандартного образца (СО) ППД (СО специфической биологической активности очищенного туберкулина). Сенсibilизируют животных внутрикожным введением в область живота (в 2 – 4 места) вакцины БЦЖ или убитых нагреванием микобактерий туберкулеза в неполном адьюванте Фрейнда (0,5 – 1 мг микобактерий на 1 животное).

Три навески исследуемой субстанции ППД, массой не менее 50 мг каждая, растворяют в фосфатном буферном растворе, pH ( $7,4 \pm 0,05$ ) таким образом, чтобы в 1 мл субстанции ППД содержалось на 20 % ниже и выше дозы навески СО ППД (получают 3 основных раствора). Сравнивают специфическую активность основного раствора с СО ППД, проводя испытание на 6 сенсibilизированных морских свинок. Для этого из основного раствора готовят разведения 1:40; 1:200 и 1:1000 и титруют относительно 5; 25 и 125 ТЕ СО, вводя внутрикожно по 0,1 мл каждого разведения сенсibilизированным морским свинкам в группе по методу случайной выборки (например, метод латинских квадратов). Ответные реакции учитывают через 24 ч. Статистический анализ основан на том, что зависимость  $\lg$  «доза – эффект» имеет линейный характер. Вычисляют средний угол наклона линий и подсчитывают логарифм относительной активности ( $\lg R$ ) – расстояние между параллельными линиями зависимости доза – эффект. Относительная активность ( $R$ ) должна быть равна ( $1,0 \pm 0,2$ ) при доверительных границах в пределах от 75 до 130 % ( $P = 0,95$ ). За доверительные границы принимают  $\pm 2$  стандартные ошибки логарифма

относительной активности. Если бóльшая испытуемая навеска имеет по сравнению с СО ППД меньшую величину, следует увеличить навески и провести титрование. Если на меньшую навеску реакции будут с большей величиной, по сравнению с СО ППД, то следует провести титрование, используя уменьшенные навески порошка испытуемой субстанции.

**Специфическая безвредность.** Отсутствие живых микобактерий туберкулеза определяют на морских свинках, содержащихся в условиях, исключающих их контаминацию живыми микобактериями туберкулеза. Раствор субстанции, содержащей 50000 ТЕ/мл в фосфатном буфере без консерванта и стабилизатора, в объеме 10 мл центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин. Верхний слой надосадочной жидкости (около 8 мл) удаляют, осадок ресуспендируют и вводят внутрибрюшинно по 1 мл 2 морским свинкам массой 250 – 300 г, за которыми наблюдают 42 сут. Животные должны оставаться здоровыми. Через 42 сут морских свинок вскрывают и проводят макроскопическое, гистологическое и бактериологическое исследование внутренних органов (селезенки, легких, печени и лимфатических узлов). При макроскопическом и микроскопическом исследовании не должно быть обнаружено патологических признаков, характерных для туберкулезной инфекции. Для бактериологического (культурального) исследования тщательно гомогенизируют лимфатические узлы (все вместе), селезенку,  $\frac{1}{4}$  часть печени и одно легкое. Гомогенизаты обрабатывают в течение 10 мин 5 % раствором серной кислоты, центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 мин, ресуспендируют в 0,9 % растворе натрия хлорида и засевают на яичную среду Левенштейна-Йенсена (не менее 5 пробирок для каждого органа). Посевы выдерживают в течение 45 сут при температуре 37 °С. Рост колоний микобактерий на поверхности среды должен отсутствовать.

**Сенсибилизирующие свойства.** Должны отсутствовать. Морским свинкам (3 особи) массой 300 – 350 г вводят внутрикожно трехкратно с интервалом 5 сут по 125 ТЕ в 0,1 мл разведения субстанции. Спустя 15 сут

этим и 3 интактным морским свинкам вводят внутрикожно по 500 ТЕ в 0,1 мл испытуемой субстанции. Разведения 125 и 500 ТЕ готовят из основного раствора субстанции, используя 0,9 % раствор натрия хлорида. Ответную реакцию учитывают через 24 ч, измеряя 2 взаимно перпендикулярных диаметра эритемы. Реакции у первых 3 морских свинок не должны отличаться от реакций у контрольных животных ( $p > 05$ ). Животных содержат в условиях, исключающих контаминацию микобактериями.

## ИСПЫТАНИЕ ТУБЕРКУЛИНА

**Описание.** Туберкулин очищенный в стандартном разведении – бесцветная прозрачная жидкость без посторонних включений. Туберкулин очищенный (лиофилизат) – пористая масса или аморфный порошок серовато-белого или кремового цвета, который для проведения испытаний разводят в 1 мл прилагаемого растворителя.

**Подлинность.** Вызывает при внутрикожном введении морским свинкам, сенсibilизированным вакциной БЦЖ, 12 – 16-суточной культурой БЦЖ или убитыми *Mycobacterium tuberculosis*, положительные реакции (как описано в разделе «Специфическая активность»).

**Прозрачность.** Должен быть прозрачным. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей».

**Цветность.** Должен быть бесцветным. Определение проводят визуально в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей».

**pH.** От 7,35 до 7,45. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Стерильность.** Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» методом прямого посева или мембранной фильтрации.

**Аномальная токсичность.** Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Вводят

внутрибрюшинно 5 белым мышам массой 17 – 20 г тест-дозу в объеме 0,5 мл; поочно 2 морским свинкам массой 250 – 300 г тест-дозу в объеме 1 мл. Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

**Специфическая активность.** Индекс специфической активности (I) туберкулина очищенного в стандартном разведении (отношение суммы реакций на испытуемый препарат к сумме реакций на СО ППД должен находиться в пределах от 0,95 до 1,05 при отсутствии достоверных различий между средними реакциями на стандартный и испытуемый образцы. Испытание проводят на 6 морских свинках, белокожих или альбиносах, массой  $(350 \pm 50)$  г, сенсibilизированных, как описано выше, для определения дозы-навески субстанции. На каждом боку ставят по 4 пробы (отдельными шприцами) с 2 ТЕ в 0,1 мл испытуемой серии и 2 ТЕ СО ППД, чередуя предварительно закодированные по методу случайной выборки 8 шприцев с препаратами. Реакции регистрируют через 24 ч.

Относительная активность (R) очищенного туберкулина, лиофилизата, должна быть равна  $(1,0 \pm 0,2)$  при доверительных границах в пределах от 75 до 130 % ( $P = 0,95$ ). Из основного разведения испытуемой серии, содержащего 50000 ТЕ в 1 мл (в ампулу добавляют 1 мл прилагаемого растворителя), готовят 3 разведения: 5; 25 и 125 ТЕ в 0,1 мл, используя для этой цели 0,9 % раствор натрия хлорида. Определение проводят по разделу «Специфическая активность – определение дозы навески субстанции», используя 5; 25 и 125 ТЕ в 0,1 мл СО ППД.

Если результат испытания выходит за допустимые пределы, испытание повторяют. Результаты первого и повторного испытаний усредняют.

**Производственные штаммы.** Для приготовления применяют туберкулиногенные штаммы микобактерий туберкулеза *M. tuberculosis* Dt/Strain, и/или T-3480 и *M. bovis* “Vallee” из Государственной коллекции ПБА. Используют не более 2 пассажей на плотной питательной среде для выращивания микобактерий, не более 2 пассажей на жидкой картофельной

среде и не более 8 пассажей на синтетической среде Линниковой-Могилевского.

**Упаковка и маркировка.** В соответствии с ОФС «Имунобиологические лекарственные препараты». На упаковке очищенного туберкулина, лиофилизата, должна быть надпись: «Только для специализированных медицинских учреждений».

**Транспортирование и хранение.** При температуре от 2 до 8 °С в условиях, исключающих замораживание.