МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Туберкулин очищенный (ППД)**

 **(аллерген туберкулезный очищенный)** ФС

 Взамен ФС 42-3302-96

 и ФС 42-3303-96

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

 Туберкулин очищенный ППД (PPD - *purified protein derivative* представляет собой туберкулопротеин, полученный путем осаждения трихлоруксусной кислотой (ТХУ) очищенных ультрафильтрацией или другим адекватным методом, инактивированных нагреванием фильтратов культур микобактерий туберкулеза (МБТ) человеческого и бычьего видов. Внутрикожное введение туберкулина 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, отбора контингентов для

прививок БЦЖ.

 ПРОИЗВОДСТВО

Работа с микобактериями должна проводиться в оборудованных автономной приточно-вытяжной вентиляцией помещениях, изолированных от помещений, где наличие микобактерий не допускается. Питательные среды перед посевом микобактерий должны быть проверены на стерильность. Выросшие в виде складчатых пленок культуры микобактерий на поверхности синтетической среды инактивируют автоклавированием при температуре 121 °С 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, высушивают, 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 один из методов получения стандартного препарата на длительный срок (20 лет и более). Субстанцию используют для производства очищенного туберкулина в стандартном разведении (2 ТЕ в 0,1 мл), предназначенного для массовой туберкулинодиагностики или очищенного туберкулина, лиофилизата, предназначенного для индивидуальной туберкулинодиагностики (в ампуле 50000ТЕ).

Предварительно серию субстанции тестируют на стерильность, отсутствие сенсибилизирующих свойств, специфическую безопасность (отсутствие живых микобактерий туберкулеза), специфическую активность – определение дозы-навески, содержащей 50 000 ТЕ. Специфическую активность туберкулинов выражают в туберкулиновых единицах (ТЕ), эквивалентных международным туберкулиновым единицам (TU).

Емкость со смесью порошков (субстанцией) хранят в эксикаторе в темном сухом месте. Срок годности субстанции – 5 лет. По истечении срока годности субстанция подлежит повторному испытанию на стерильность и специфическую активность на животных (подтверждение дозы-навески).

**Тестирование субстанции:**

 **Стерильность**. Должен быть стерильным. 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 Несслера».

 **Специфическая активность.** Установление дозы-навески субстанции ППД, содержащей 50000ТЕ. Определение проводят на 18 сенсибилизированных морских свинках путем сопоставления активности разведений навесок порошка (субстанции) с активностью СО ППД (СО специфической биологической активности очищенного туберкулина). Сенсибилизируют 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 рН 7,4± 0,05 из расчета содержания в 1 мл количества порошка равного, на 20 % ниже и выше дозы навески СО ППД-Л-2 (получают три основных раствора). Каждый основной раствор сопоставляют с СО ППД на 6 сенсибилизированных морских свинках. Для этого из основного раствора готовят разведения 1:40, 1:200 и 1:1000 и титруют относительно 5ТЕ, 25ТЕ и 125 ТЕ СО, вводя внутрикожно по 0,1 мл каждого сенсибилизированным морским свинкам по методу случайной выборки (например, метод латинских квадратов). Ответные реакции учитывают через 24 часа. Статистический анализ основан на том, что зависимость lg дозы-эффект имеет линейный характер. Вычисляют средний угол наклона линий и подсчитывают логарифм относительной активности (lgR) - расстояние между параллельными линиями зависимости доза-эффект. Относительная активность (R) должна быть равна 1,0±0,2 при доверительных границах в пределах от 75 до 130% (Р=0,95). За доверительные границы принимают ±2 стандартные ошибки логарифма относительной активности. Если большая испытуемая навеска имеет по сравнению с СО ППД меньшую величину, следует увеличить навески и провести титрование. Если на меньшую навеску реакции будут больше, чем на СО, то следует провести титрование, используя уменьшенные навески порошка испытуемой субстанции.

 **Специфическая безвредность**. Определяют отсутствие живых микобактерий туберкулеза на морских свинках, содержащихся в условиях, исключающих контаминацию живыми микобактериями туберкулеза. 10 мл раствора субстанции, содержащей 50000ТЕ в 1,0 мл фосфатного буфера без консерванта и стабилизатора, центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин. Верхний слой надосадочной жидкости (около 8 мл) удаляют, осадок ресуспендируют и вводят внутрибрюшинно по 1,0 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 культуральное исследование внутренних органов (селезенки, легких, печени и лимфатических узлов). При макроскопическом и микроскопическом исследовании не должно быть патологических признаков, характерных для туберкулезной инфекции. Для культурального исследования тщательно гомогенизируют лимфатические узлы (все вместе), селезенку, ¼ 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. Трем морским свинкам 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 трем 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 трех свинок не должны отличаться от реакций у контрольных животных (p>05). Животных содержат в условиях исключающих контаминацию микобактериями.

 ИСПЫТАНИЕ

**Описание.** Туберкулин очищенный в стандартном разведении –

бесцветная прозрачная жидкость без посторонних включений. Очищенный туберкулин – 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, сенсибилизированным вакциной БЦЖ, 12-16 суточной культурой БЦЖ, или убитыми *M.tuberculosis*, положительные реакции (по разделу 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».

**рН**. 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 токсичност**ь. Должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность»: на 5 белых мышах массой 17−20 г, тест-дозу 0,5 мл вводят внутрибрюшинно; на 2 морских свинках массой 250-300 г, тест-дозу 1,0 мл вводят внутрибрюштнно. 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±50 г, сенсибилизированных как описано в разделе «Специфическая активность – определение дозы-навески субстанции». На каждом боку ставят по 4 пробы (отдельными шприцами) с 2 ТЕ в 0,1 мл испытуемой серии и 2ТЕ ОСО ППД, чередуя предварительно закодированные по методу случайной выборки 8 шприцев с препаратами. Реакции регистрируют через 24 часа.

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

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

**Производственные штаммы.** Для приготовления применяют туберкулиногенные штаммы микобактерий туберкулеза человеческого *Myсobaсterium tuberculosis Dt/Strain*, Т-3480 и бычьего *Mycobaсterium bovis “Vallee”* видов 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 «Иммунобиологические лекарственные препараты». На упаковке очищенного туберкулина, лиофилизат должна быть надпись «Только для специализированных медицинских учреждений».

**Транспортирование**.При температуре от 2 до 8 оС в условиях, исключающих замораживание. Допускается транспортирование при температуре не выше 18 °С в течение 15 дней.

**Хранение.** При температуре от 2 до 8 оС.