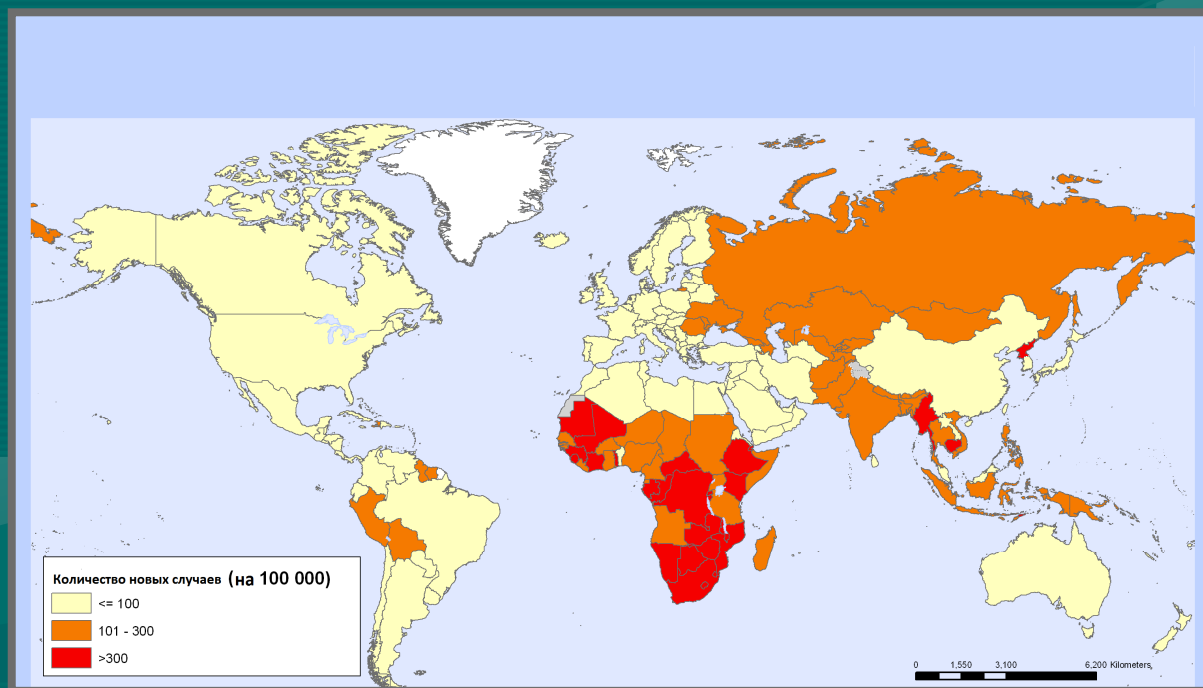


ПРЕПАРАТ «ДИАСКИНТЕСТ» для диагностики туберкулезной инфекции у детей и взрослых

Коллектив авторов



Заболеваемость туберкулезом по данным ВОЗ на 2010 г.

ДИАГНОСТИКА

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЗАКОН
18 июня 2001 г.
№ 77-ФЗ
«О ПРЕДУПРЕЖДЕНИИ
РАСПРОСТРАНЕНИЯ
ТУБЕРКУЛЁЗА В
РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ»

Массовое ежегодное обследование населения для активного выявления туберкулеза проводится у взрослых методом флюорографии, у детей – с помощью туберкулинодиагностик и (проба Манту).

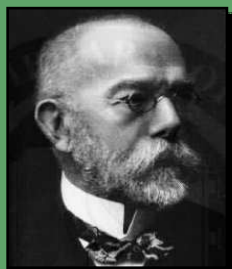
Дообследование:

инструментальные, лабораторные, клинико-рентгенологические методы.



Проба Манту (проба Пирке, туберкулиновая проба, туберкулинодиагностика, tuberculin skin-test, PPD test) – метод исследования напряженности иммунитета к возбудителю туберкулеза с помощью оценки местной, кожной реакции на туберкулин.

ИСТОРИЯ ТУБЕРКУЛИНОДИАГНОСТИКИ



1890:
R. Koch

•Туберкулин в его классическом виде был изобретен в 1890 г. Робертом Кохом. Врач Пирке в 1907 году впервые предложил применять туберкулин для диагностики туберкулеза. Врач Манту предложил внутрикожное введение туберкулина. Проба в модификации Манту применяется в России с 1965 года.



1907:
von
Pirquet

• Туберкулин— это лизат микобактерий туберкулеза, инактивированных нагреванием. С конца 60-х годов 20-го столетия были разработаны более чистые препараты туберкулина, так называемые PPD (Purified Protein Derivate – очищенный дериват белка), которые применяются и по сей день. В России применяется препарат ППД-А, т.е. очищенный туберкулин, полученный М.А.Линниковой в 1965 году.



1910:
Mantoux

•Туберкулинодиагностика, или проба Манту, на протяжении 100 лет продолжает оставаться одним из наиболее широко распространенных методов диагностики туберкулеза в мире при массовых эпидемиологических обследованиях населения.

ПРОБА МАНТУ

Плюсы

и

минусы

Простота постановки и учета результатов реакции

Низкая стоимость препарата

Низкая специфичность

Не выявляет различий между другими видами микобактерий

Дает положительный результат у БЦЖ - вакцинированных людей

Зависит от аллергических реакции



ПРОБА МАНТУ

Проба ежегодно проводится в РФ в среднем у 20 млн детей и подростков:

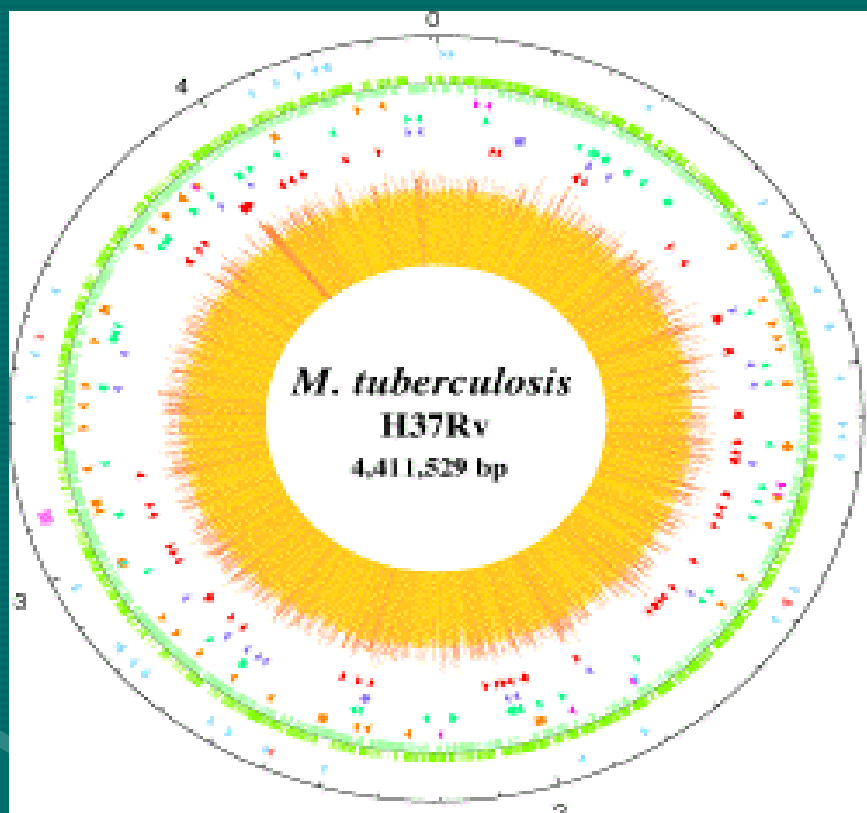
- **40% ложноположительных** результатов (8 млн случаев в год)

Ежегодные расходы, связанные со скринингом, дополнительным обследованием и диспансерным наблюдением, составляют в РФ свыше **2 миллиардов рублей**

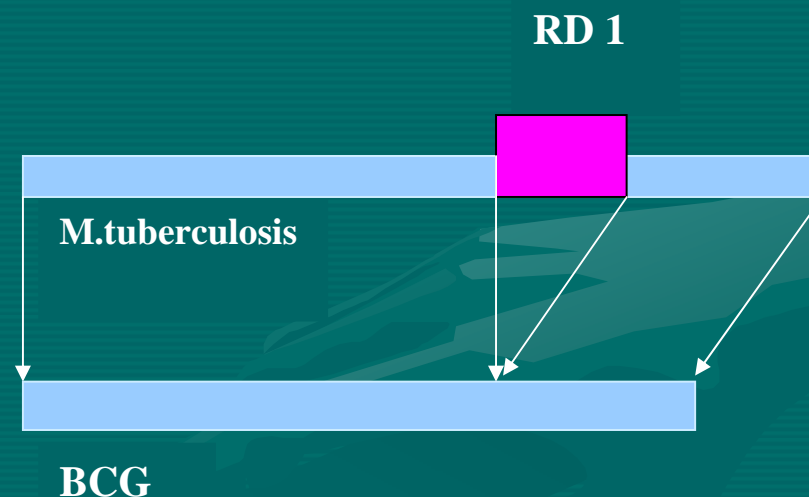
(расчет затрат включал стоимость туберкулина, процедуры проведения пробы, курса превентивной терапии и минимальные цены тарифов на медицинские услуги в различных регионах)

С помощью туберкулинового теста невозможно дифференцировать активный процесс, вакцинацию ВССГ, латентную инфекцию, перенесенный туберкулез, перекрестную сенсибилизацию другими микобактериями.

ГЕНОМ *M. tuberculosis*



Генетические карты



Геном возбудителя
туберкулеза
содержит около 4000 генов

RD1 – 10KB кодирует:
- early secretory antigenic target
(ESAT) – 6 kD
- culture filtrate protein 10 (CFP) – 10 kD

ТЕСТЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ IN VITRO

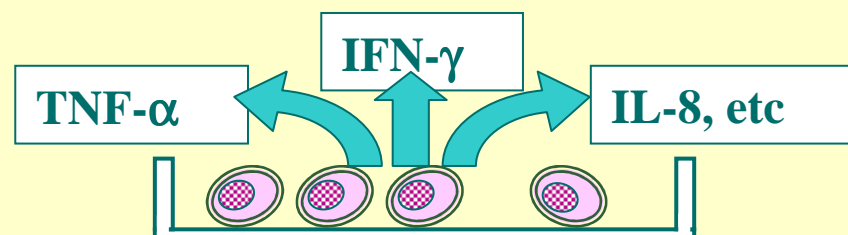
По крови - IGRA (Interferon-Gamma Release Assays) -

QFT (QuantiFERON – TB Gold In–Tube test),
ELISPOT – (Enzyme – linked immunosorbent spot)


Основаны на высвобождении
гамма-интерферона при контакте
Т-лимфоцитов крови
инфицированного пациента со
специфическими антигенами -
белками ESAT-6 и CFP-10

Прибор измеряет
количество
выделенного гамма-
интерферона

Определение уровня IFN- γ



НЕДОСТАТКИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ИФА ТЕСТ - СИСТЕМ (IGRA, QFT, ELISPOT)



Высокая стоимость (от 18 до 40 евро за 1 исследование)
Потребность в оснащенной лаборатории
Требование к обработке крови для поддержания жизнеспособности лимфоцитов
Внутривенные манипуляции

Высокая стоимость
(от 18 до 40 евро за 1 исследование)

Потребность в оснащенной лаборатории

Требование к обработке крови для
поддержания жизнеспособности лимфоцитов

Внутривенные манипуляции

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЭТАПЫ ПОЛУЧЕНИЯ ГИБРИДНОГО БЕЛКА CFP10-ESAT6 ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРЕПАРАТА «ДИАСКИНТЕСТ»

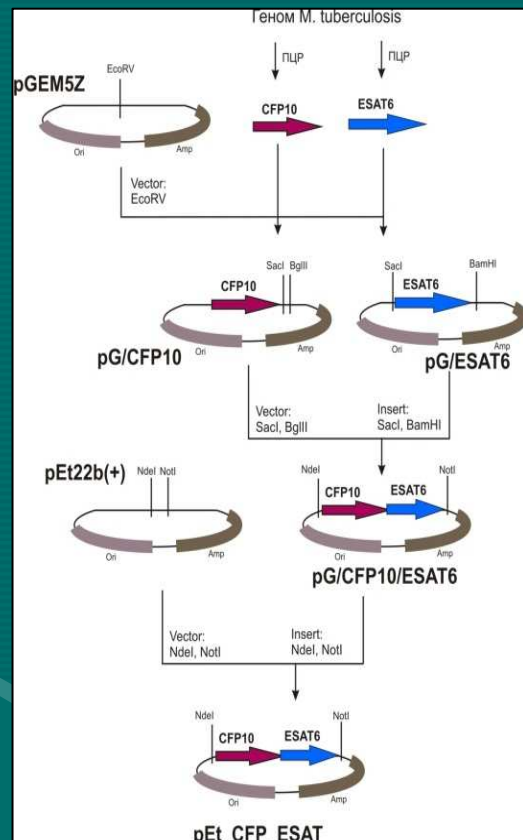
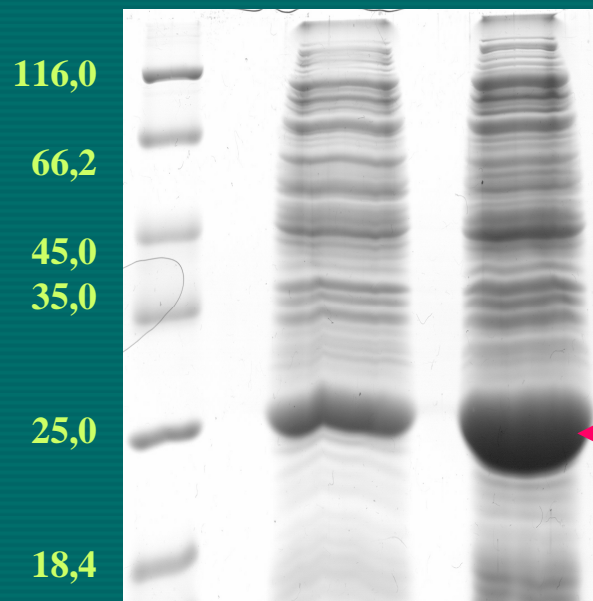


Схема клонирования
гибридного белка
CFP10-ESAT6
в экспрессионный вектор
pET22b(+) (Novagene)



Экспрессия гибридного
белка
CFP-ESAT в клетках
E. coli

CFP-
ESAT

Очищенный
препарат
гибридного белка
CFP-ESAT для
кожной
диагностической
пробы

ПРЕПАРАТ «ДИАСКИНТЕСТ» - НОВЫЙ КОЖНЫЙ ТЕСТ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Киселев В.И., Пальцев М.А.

Гибридный белок CFP10-
ESAT6, индуцирующий
реакцию
гиперчувствительности
замедленного типа в
отношении *M.tuberculosis*,
кодирующая его химерная
нуклеиновая кислота и
рекомбинантный
плазмидный
экспрессирующий вектор, ее
содержащий, способ
получения гибридного белка
и дозированная
лекарственная форма для
внутрикожной инъекции на
его основе.

*Патент на изобретение РФ
№2360926, приоритет от 17
марта 2008 г.*



ПРОИЗВОДСТВО ДИАСКИНТЕСТА



На базе ЗАО «Фармацевтическая фирма «ЛЕККО» (Владимирская обл.). Производство отвечает требованиям GMP и включает в себя все стадии технологического процесса (от создания мастер-банка культуры клеток до получения готовой лекарственной формы).



ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича Минздравсоцразвития России

Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН

Острая токсичность на беспородных мышах

Острая и хроническая токсичность различных разведений препарата «Диаскин-тест» на линейных мышах

Специфическая активность на морских свинках, иммунизированных туберкулезной вакциной (БЦЖ)

Специфическая активность на морских свинках, зараженных (сенсibilизированных) вирулентными штаммами микобактерий туберкулеза

Острая токсичность, местная реакция, сенсibilизирующее действие на здоровых интактных морских свинках

Шоковая реакция на морских свинках, зараженных вирулентным штаммом микобактерий туберкулеза

Специфическая активность на сенсibilизированных атипичными микобактериями морских свинках

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Доклинические исследования проводились в сравнении с национальным стандартом очищенного туберкулина.

- Концентрированный препарат и стандартное разведение препарата «Диаскинтест»:
- нетоксичны
- не обладают сенсibiliзирующими свойствами
- безопасны

ОЦЕНКА ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА

у морских свинок с помощью кожного теста с
рекомбинантным белком ESAT6-CFP10

Антигены	Диаметр кожной реакции у морских свинок, иммунизированных:		
	M. bovis BCG	M.avium	M.tuberculosis
ППД -t (M. tuberculosis)	8,9 ± 1,3	8,0 ± 1,4	12,9 ± 1,2
ППД-b (M. bovis BCG)	12,1 ± 1,3	9,5 ± 1,5	9,8 ± 1,5
ППД-a (M. avium)	8,8 ± 1,5	12,6 ± 1,4	9,2 ± 1,3
ESAT6-CFP10	0,5 ± 1,0	0,6 ± 1,0	11,2 ± 1,3

Препарат Диаскинтест:

специфичен – не вызывает положительных реакций у здоровых животных и вакцинированных BCG

чувствителен – положителен у зараженных, а с нарастанием туберкулезных поражений увеличиваются ответные реакции.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

С 2008 года в клинических исследованиях и пострегистрационных наблюдениях было обследовано около 5,0 ТЫС. человек, в том числе 4,6 ТЫС. детей и подростков.

В рамках Федеральной целевой программы по борьбе с социально значимыми заболеваниями (подпрограмма «Борьба с туберкулезом») в течение 2009 — 2010 гг. в регионы было поставлено более 4,5 МЛН. проб препарата «Диаскинтест».

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения г. Москвы

ЦНИИ туберкулеза РАМН

НИИ фтизиопульмонологии
Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Санкт-Петербургский НИИ
фтизиопульмонологии Минздравсоцразвития РФ

Самарский областной детский санаторий «Юность»

Противотуберкулезные диспансеры г. Москвы

Самарский областной противотуберкулёзный диспансер

Рязанский областной противотуберкулёзный диспансер.

Результаты проб с препаратом «Диаскинтест» и туберкулином ППД-Л2 в исследуемых группах

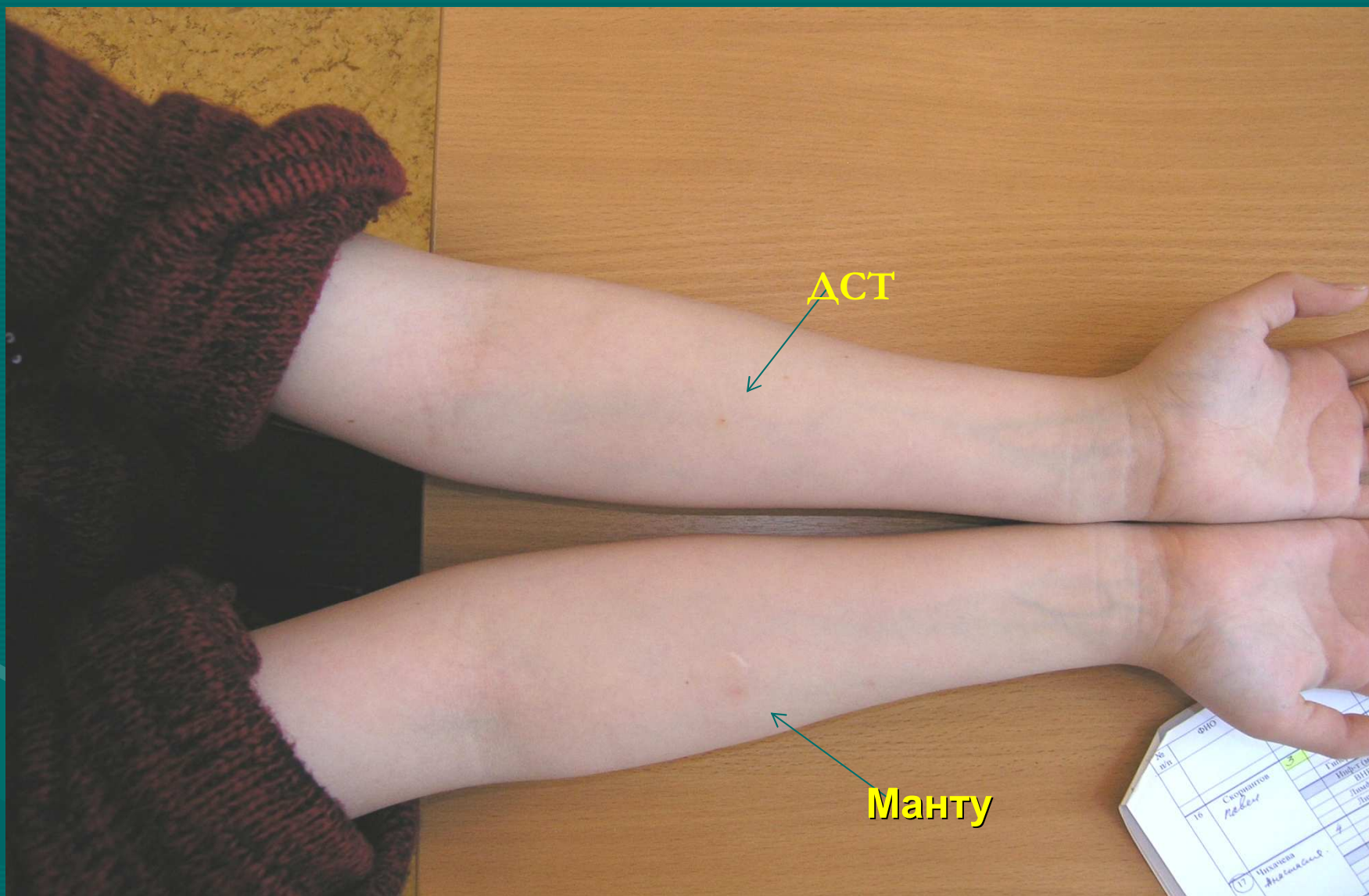
№ группы	Результаты проб					
	«Диаскинтест»			Туберкулин ППД-Л2		
	Положи- тельный	Сомни- тельный	Отрица- тельный	Положи- тельный	Сомни- тельный	Отрица- тельный
Больные ТБ органов дыхания	59	0	0	59	0	0
Больные ТБ легких с тяжелым течением болезни	3	0	4	2	0	5
Больные ТБ органов дыхания, завершившие терапию	10	0	5	15	0	0
Пациенты без активного ТБ	0	0	7	5	1	1
Дети и подростки с «виражом» Манту	13	0	0	13	0	0
Дети и подростки с положительной Манту на протяжении предыдущих нескольких лет	0	2	27	24	3	2
Дети с осложнениями на БЦЖ (больные БЦЖ - оститами)	0	0	20	20	0	0
ИТОГО	85	2	63	138	4	8

КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

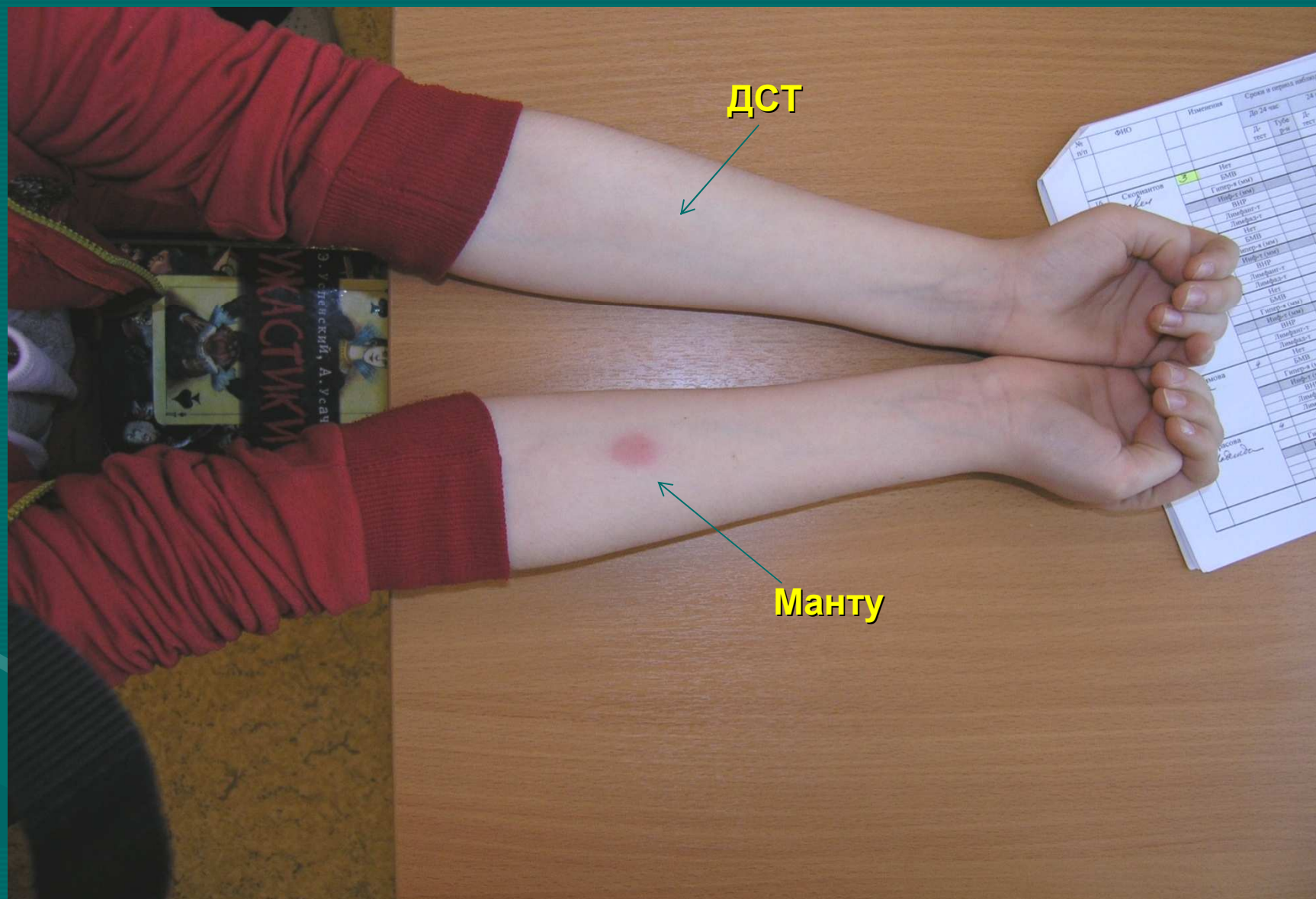
Контингент обследованных	Коли- чество	Диаскинтест		Туберкулин ППД-Λ2	
		+	-	+	-
Дети и подростки					
Больные туберкулезом органов дыхания	60	49	11	59	1
Пациенты с виражом туберкулиновой пробы из семейного контакта с бактериовыделителем	27	17	10	26	1
Пациенты с виражом туберкулиновой пробы с неустановленным контактом	18	4	14	18	0
Пациенты с гиперергической реакцией на туберкулин	33	18	15	33	0
Пациенты с усиливающейся туберкулиновой чувствительностью	22	6	16	22	0
Пациенты, длительно (более 3 лет) имеющие положительную реакцию с туберкулином.	55	1	54	55	0
Пациенты, наблюдаемые по контакту с больными туберкулезом без бактериовыделения.	23	4	19	18	5
Пациенты после (от 1 до 3 лет) после вакцинации или ревакцинации БЦЖ	46	0	46	42	4
Больные неспецифическими заболеваниями органов дыхания	16	0	16	1	15
ИТОГО:	300	99	201	274	26

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИАСКИНТЕСТА И ПРОБЫ МАНТУ

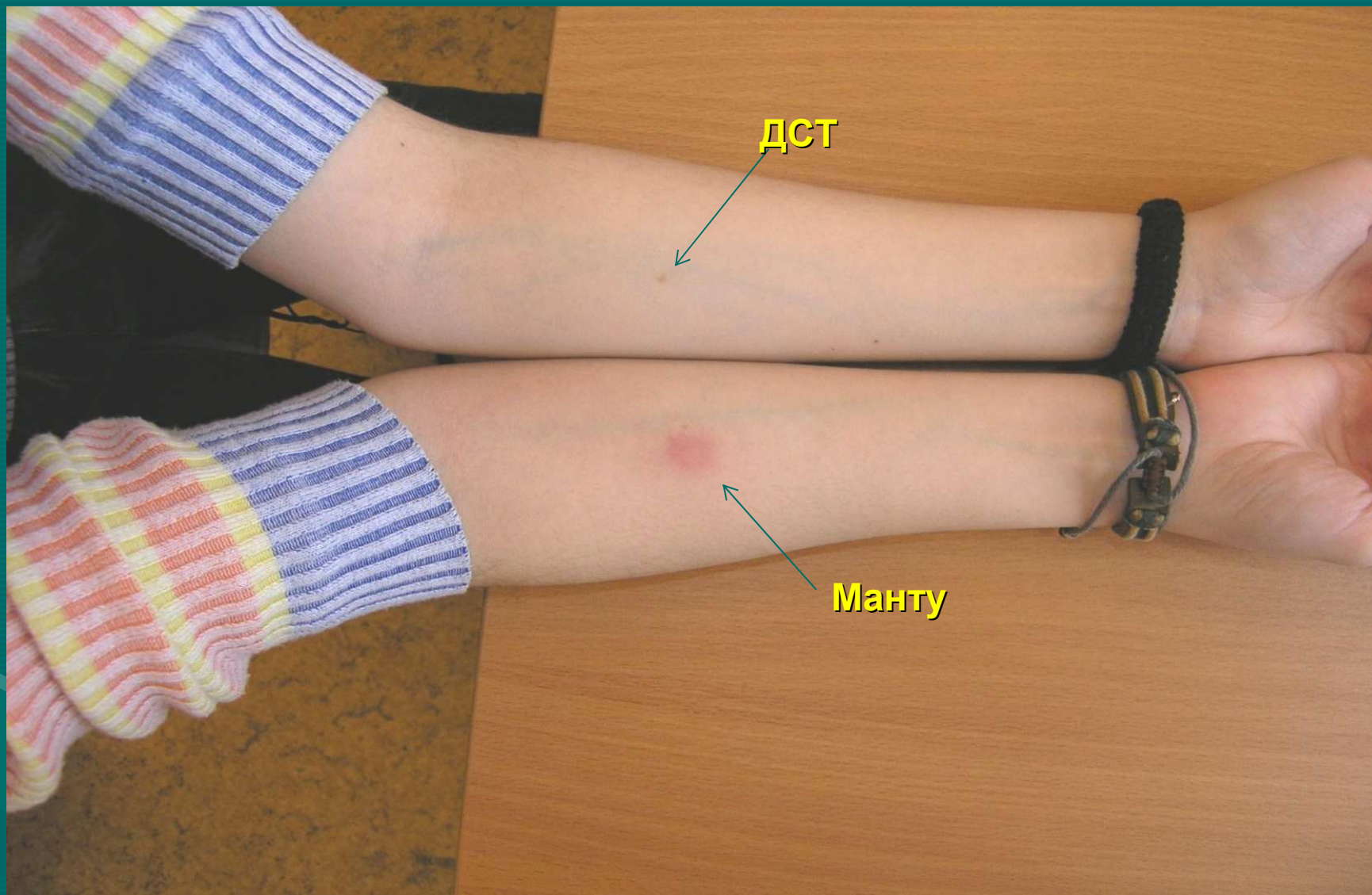
ПАРАМЕТРЫ	ДИАСКИНТЕСТ 0,2 мкг в 0,1 мл	ПРОБА МАНТУ с 2 ТЕ туберкулина
Чувствительность	98 – 100 %	85 – 90 %
Специфичность	90 – 100 %	40 – 60 %
Гиперчувствительность замедленного типа к БЦЖ вакцинированным	Нет	50 %
Наличие аллергических реакций	0,5 - 1 %	10 %
Реакция на осложнения после БЦЖ вакцинации	Отсутствует	Положительная



Пациент Ч. А. 15 лет, здорова



М. А. 11 л. На учете с 2005 г. по поводу контакта, химиопроф. не получала

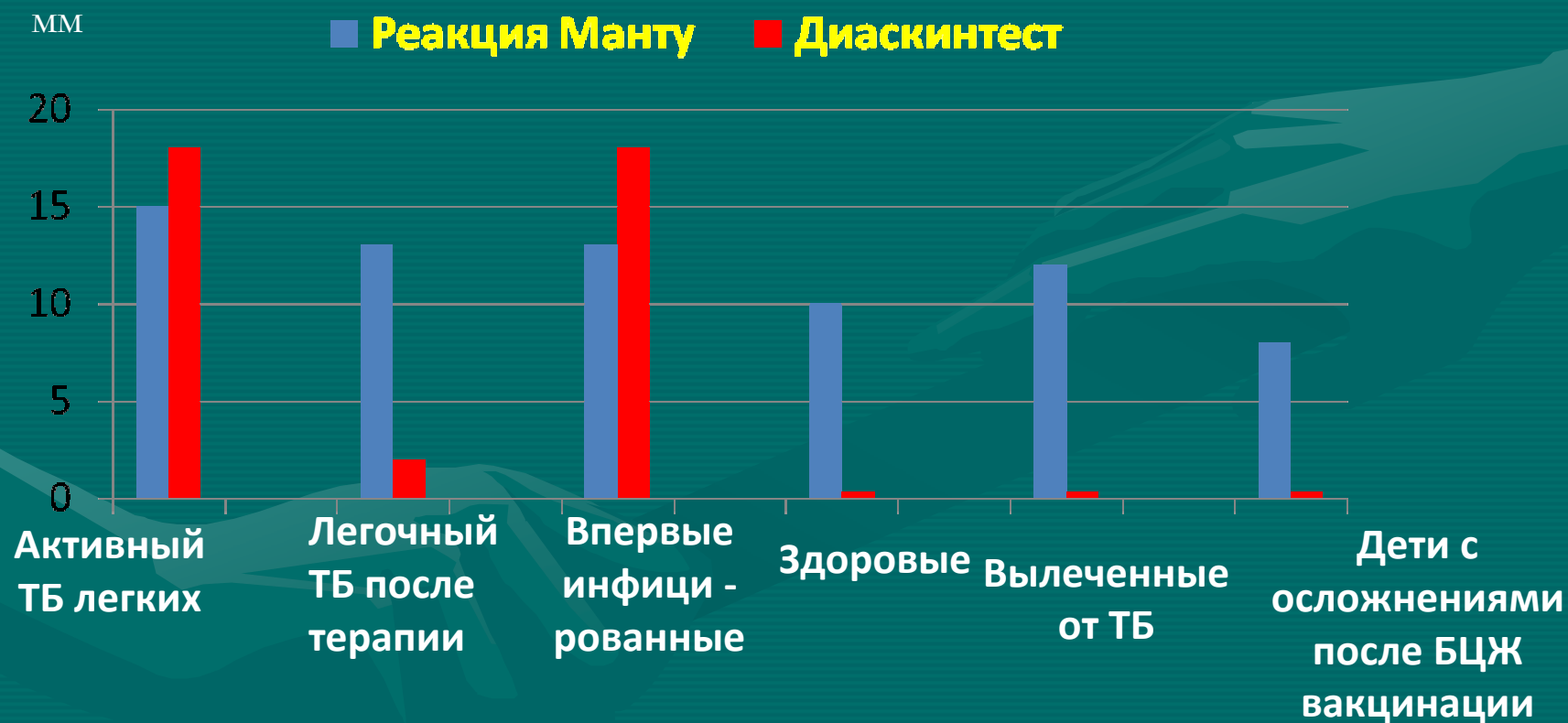


А, 17 лет. На учете по поводу инфицирования ТБ с 2004 г., ежегодная превентивная химиотерапия.



Н.А. 9 лет ТВ очаг в легких.

Результаты применения Диаскинтеста для тестирования различных групп пациентов .





Спасибо за внимание!