

СТАБИЛЬНОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ДИАСКИНТЕСТ® ПРИ ХРАНЕНИИ В СТРЕСС-УСЛОВИЯХ

И.В. Бочарова¹, К.Б. Майоров¹, О.В. Демикова¹, Д.А. Кудлай²

STABILITY OF SPECIFIC ACTIVITY AND SPECIFICITY OF DIAGNOSTIC PRODUCT DIASKINTEST® IN STORAGE UNDER STRESS CONDITIONS

I.V. Bocharova, K.B. Majorov, O.V. Demikhova, D.A. Kudlay

Проведено исследование по оценке стабильности диагностического препарата ДИАСКИНТЕСТ® – аллерген туберкулёзный рекомбинантный в стандартном разведении, раствора для внутрикожного введения, по показателям «Специфическая активность» и «Специфичность» на морских свинках, согласно требованиям ФСП ЛСР-006435/08-110808, в зависимости от температуры и длительности хранения. Установлено отсутствие достоверных различий специфической активности и специфичности препарата ДИАСКИНТЕСТ® в зависимости от температуры хранения препарата в диапазоне от 2°C до 23°C и длительности хранения от 7 до 30 дней.

Ключевые слова: диагностика туберкулёза, «ДИАСКИНТЕСТ®» –аллерген туберкулёзный рекомбинантный в стандартном разведении, *M.tuberculosis*, вакцинация BCG, индекс специфической активности.

A study to assess the stability of the diagnostic product DIASKINTEST® – TB recombinant allergen in the standard dilution, solution for intradermal administration, in terms of «specific activity» and «specificity» in guinea pigs, according to the requirements of FSP LSR-006435/08-110808, depending on storage temperature and time, was performed. The absence of significant differences in the specific activity and specificity of the DIASKINTEST® was found depending on the storage temperature in the range of 2°C to 23°C and the duration of storage of 7 to 30 days.

Keywords: diagnosis of tuberculosis, DIASKINTEST® – allergen tuberculous recombinant in the standard dilution, *M. tuberculosis*, BCG vaccination, index of specific activity.

Введение

Одним из диагностических тестов для выявления раннего инфицирования микобактериями туберкулёза (МБТ), является рекомбинантный туберкулёзный аллерген – ДИАСКИНТЕСТ®, разработанный в НИИ молекулярной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова [1]. Основой препарата является гибридный белок, состоящий из двух антигенов, специфичных для МБТ – CFP-10 и ESAT-6. Именно эти белки играют ключевую роль в диагностике и оценке развития МБТ-инфекции [4, 5, 6]. Зарегистрированный в 2008 г. (№ ЛСР-006435/08), ДИАСКИНТЕСТ® хранится и транспортируется согласно СП 3.3.2.1248-03

при температуре от 2°C до 8°C [3]. Однако в условиях массового применения препарата и при транспортировке, и при повседневной работе в диагностических кабинетах эти условия могут нарушаться, что может вызвать сомнения в результатах проб. Это обусловило необходимость исследования стабильности ДИАСКИНТЕСТА® при отклонении от требуемых условий хранения.

Цель исследования – определение специфической активности и специфичности диагностического препарата ДИАСКИНТЕСТ® производства компании «Генериум» (Москва) при нестандартных условиях хранения.

¹ ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва

² ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации» Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации, г. Москва

Табл. 1. Группы экспериментальных животных, используемые в эксперименте

№	Инфицирование	Тестирование	t° хранения препарата	Количество животных в группе
1	МБТН ₃₇ Rv аэрогенно	Специфическая активность «ДИАСКИНТЕСТ®» серий 010413; 020413; 030513	2-8°C в течение 30 дней	18
2	МБТН ₃₇ Rv аэрогенно	Специфическая активность «ДИАСКИНТЕСТ®» серий 010413; 020413; 030513	13°C в течение 30 дней	18
3	МБТН ₃₇ Rv аэрогенно	Специфическая активность «ДИАСКИНТЕСТ®» серий 010413; 020413; 030513	23°C в течение 7 дней	18
4	BCG-M внутрикожно	Специфичность «ДИАСКИНТЕСТ®» серий 010413; 020413; 030513	2-8°C в течение 30 дней	9
5	BCG-M внутрикожно	Специфичность «ДИАСКИНТЕСТ®» серий 010413; 020413; 030513	13°C в течение 30 дней	9
6	BCG-M внутрикожно	Специфичность «ДИАСКИНТЕСТ®» серий 010413; 020413; 030513	23°C в течение 7 дней	9

Задачи исследования

Для выполнения поставленной цели были определены следующие задачи:

а) провести *in vivo* исследование специфической активности трех промышленных серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® (t° хранения – 13±2°C в течение 30 дней и t° хранения – 23±2°C в течение 7 дней) на морских свинках, инфицированных вирулентной культурой *M. tuberculosis* штамма H₃₇Rv;

б) провести *in vivo* исследование специфичности трех промышленных серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® (t° хранения – 13±2°C в течение 30 дней и t° хранения – 23±2°C в течение 7 дней) на BCG-вакцинированных морских свинках.

Материалы и методы исследования

Исследуемые препараты – производственные серии препарата «ДИАСКИНТЕСТ®» (010413; 020413; 030513) и Разведенный Стандартный Образец предприятия (PCOp) препарата «ДИАСКИНТЕСТ®» серии 01/050113. 1 доза препарата и PCOp содержит 0,2 мкг/100 мкл активного вещества – рекомбинантного белка CFP-10–ESAT-6.

Аллерген туберкулёзный в стандартном разведении – туберкулин – 1 доза препарата содержит 2ТЕ/100 мкл.

Вакцина туберкулёзная (BCG) сухая для внутрикожного введения BCG-1 производства Филиал «Медгамал» НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, г. Москва.

M. tuberculosis – фильтрованная вирулентная культура штамма H₃₇Rv.

Экспериментальные животные

Исследование проводили на самках аутбредных морских свинок-альбиносов, полученных из филиала «Андреевка» ФГБУ НЦБМ РАМН. Вес морских свинок перед инфицированием – 370-380 г. Перед началом эксперимента животные

прошли двухнедельное карантинирование. В течение всего эксперимента животные содержались в стандартных условиях, согласно ветеринарно-санитарным требованиям РФ [2]. Морских свинок инфицировали аэрозольным введением *M. tuberculosis* штамма H₃₇Rv из коллекции института Пастера (Франция) с использованием аппарата для аэрогенного инфицирования фирмы «GlasCol» (США) в дозе 300 КОЕ/легкое, согласно ФСП ЛСР-006435/08-110808 [3]. Вакцинацию животных проводили внутрикожно, в области живота, в количестве 0,5 мг сухой вакцины /100 мкл растворителя на одно животное. Температура хранения PCOp препарата ДИАСКИНТЕСТ®, относительно которого определяли специфическую активность всех исследованных серий с разной температурой хранения, соответствовала ФСП ЛСР-006435/08-110808, т.е. поддерживалась в пределах 2-8°C. Для хранения исследуемых образцов препарата ДИАСКИНТЕСТ® при температуре 13°C в течение 30 дней использовали термостат фирмы «Sanyo» модель MIR-153 с функцией принудительного охлаждения. Образцы препарата ДИАСКИНТЕСТ® с температурой хранения 23°C выдерживали в течение 7 дней в термостате «BINDER», Германия.

Экспериментальных животных разделили на группы, представленные в таблице 1.

Тестирование специфической активности и специфичности трех представленных производственных серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® проводили слепым методом через пять недель после инфицирования и вакцинации соответствующих групп, чередуя шприцы с препаратами по методу случайных чисел, используя предварительно подготовленные таблицы кодов. Количество животных в группе для тестирования каждой серии определено в ФСП ЛСР-006435/08-110808 и составило шесть животных для тестирования специфической активности и три – для оценки специфичности [3]. Препараты

Табл. 2. Значения среднего диаметра эритем у морских свинок, инфицированных *M. tuberculosis* штамма H₃₇Rv, в ответ на введение исследуемых серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® при различных условиях хранения и введение РСОп ДИАСКИНТЕСТа

	Условия хранения	Серия 010413/PCOp	Серия 020413/PCOp	Серия 030513/PCOp
D (mm)	t° = -2-8°C 30 дней	12,0/11,96	11,58/11,75	13,4/13,0
	t° = 13°C 30 дней	13,04/13,04	13,17/13,46	13,79/13,75
	t° = 23°C 7 дней	11,88/11,96	13,79/13,71	12,04/12,12

p > 0,05 для всех испытуемых серий препарата ДИАСКИНТЕСТ®.

вводили внутрикожно в количестве 100 мкл на 1 кожную пробу. Учет проб проводили через 24 часа после введения. Специфическую активность оценивали с помощью индекса специфической активности (I) по отношению к производственному стандарту (PCOp), а специфичность – по отсутствию эритем у BCG-вакцинированных животных в ответ на введение ДИАСКИНТЕСТа® и их появлению в ответ на введение туберкулина в стандартной дозе.

Статистический анализ проведен с помощью программного обеспечения «Биостатистика» и «MSOfficeExcel». Оценивали среднее значение диаметра эритем (в мм) в ответ на введение ДИАСКИНТЕСТа® (M), индекс специфической активности тестируемых серий ДИАСКИНТЕСТа®, ошибку среднего (SEM), стандартное отклонение (SD), статистическую значимость (p) при 95% доверительном интервале.

Результаты исследования

Полученные данные показывают (табл. 2 и рис.), что средний диаметр эритем у инфицированных животных в ответ на

введение ДИАСКИНТЕСТа® равнялся 12-14 мм вне зависимости от температуры и длительности хранения. Индекс специфической активности тестируемых серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® находился в пределах 0,9 до 1,05, что соответствует требованиям ФСП ЛСП-006435/08-110808. Не обнаружено достоверных отличий (p ≥ 0,05) специфической активности в зависимости от измененных условий хранения представленных серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® относительно РСОп серии 01/050113. В группах морских свинок, вакцинированных BCG, внутрикожное введение всех исследованных серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® не вызывало появления эритем, в отличие от внутрикожного введения туберкулина в стандартной дозе – 2ТЕ, что доказывает наличие в препарате специфических белков CFP-10 и ESAT-6, присутствующих в вирулентных штаммах микобактерий туберкулеза и отсутствующих в вакцинном штамме BCG.

Заключение

Еще на стадии разработки препарата ДИАСКИНТЕСТ® изучение физико-химических свойств полученного гетеродимера

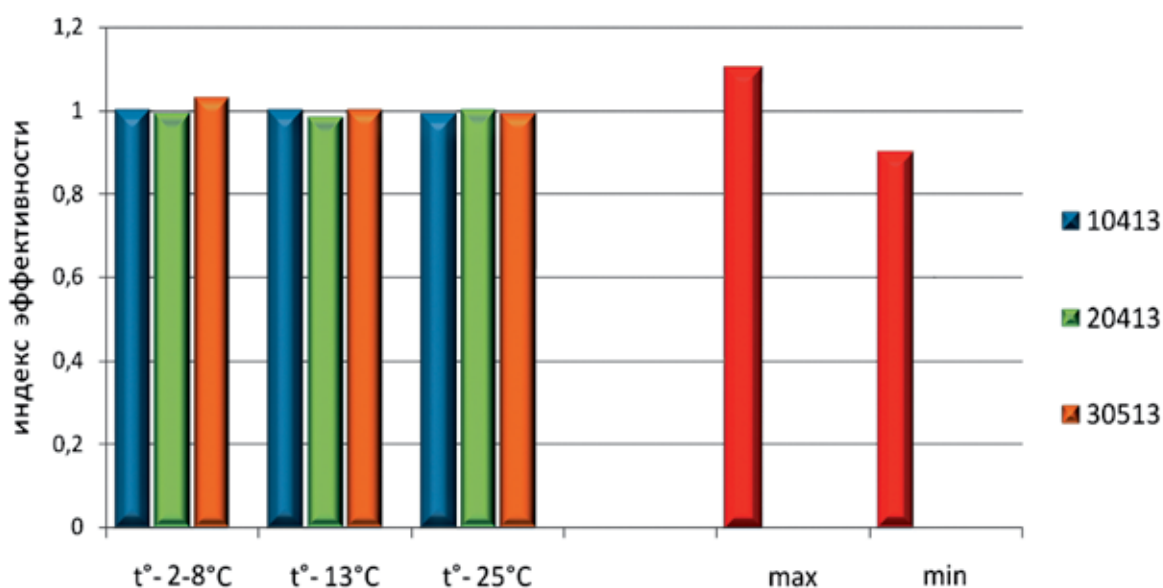


Рис. Значения индекса эффективности специфической активности трех промышленных серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® (010413, 020413, 030513) у морских свинок, аэрогенно инфицированных *M. tuberculosis* штамма H₃₇Rv через 5 недель после инфицирования при различных температурах хранения (p > 0,05). Значения «max» и «min» соответствуют параметрам индекса эффективности, утвержденным Фармакопейной статьей предприятия.

CFP-10 и ESAT-6 свидетельствовало о его высокой термодинамической и биологической стабильности. Проведенная серия экспериментов убедительно показала *in vivo* стабильность специфической активности и специфичности в отношении вирулентных штаммов *M. tuberculosis* ДИАСКИНТЕСТА®, несмотря на изменение условий его хранения. При температуре хранения 13°C в течение 30 дней и 23°C в течение 7 дней его специфическая активность и специфичность были аналогич-

ны показателям специфической активности и специфичности аналогичных серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® с условиями хранения, утвержденными в ФСП ЛСР-006435/08-110808, а именно 2-8°C. Во всех тестах значения кожных проб в ответ на введение диагностического препарата ДИАСКИНТЕСТ® соответствовали требованиям утвержденной Фармакопейной Статьи Предприятия.

Литература

1. Кожная проба с препаратом «ДИАСКИНТЕСТ» – новые возможности идентификации туберкулёзной инфекции / Под ред. М.А. Пальцева. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2010. – 176 с.
2. Приказ Минздравсоцразвития Российской Федерации от 23.08.2010г. № 708-н «Об утверждении правил лабораторной практики».
3. Фармакопейная статья предприятия на «ДИАСКИНТЕСТ®» – аллерген туберкулёзный рекомбинантный в стандартном разведении, ЛСР-006435/08 от 11.08.2008.
4. Arend S., Franken W., Aggerbeck H. et al. Double blind randomized Phase I study comparing rdESAT-6 to tuberculin as skin test reagent in the diagnosis of tuberculosis infection // *Tuberculosis (Edinb.)*. – 2008. – Vol. 88. – P. 249-261.
5. Majlessi L., Brodin P. et al. Influence of ESAT6 secretion system 1 (RD1) of *M. tuberculosis* on the interaction between *Mycobacteria* and the host immune system // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 174. – P. 3570-3579.
6. Mustafa A. Biotechnology in the Development of New Vaccines and Diagnostic Reagents Against Tuberculosis // *Current Pharmaceutical Biotechnology* – 2001. – Vol. 2. – P. 157-173.

Сведения об авторах

Бочарова Ирина Владимировна – старший научный сотрудник отдела иммунологии, заведующая виварием ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Телефон: (499) 780 47 14

e-mail: 3595598@mail.ru

Демикова Ольга Владимировна – заместитель директора по научной работе ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва, доктор медицинских наук, профессор

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Телефон: (499) 785 91 59

e-mail: demikhova@mail.ru

Майоров Константин Борисович – старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Телефон: (499) 780 90 91

e-mail: majorov@list.ru

Кудлай Дмитрий Анатолевич – профессор кафедры экономики и маркетинга ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации» Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации, г. Москва, доктор медицинских наук

e-mail: dakudlay@generiumzao.ru