

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НОВОГО КОЖНОГО ТЕСТА ДИАСКИНТЕСТ® ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

*В. И. КИСЕЛЕВ<sup>1</sup>, П. М. БАРАНОВСКИЙ<sup>1</sup>, И. В. РУДЫХ<sup>1</sup>, А. М. ШУСТЕР<sup>2</sup>,  
В. А. МАРТЪЯНОВ<sup>2</sup>, Б. Л. МЕДНИКОВ<sup>2</sup>, А. В. ДЕМИН<sup>2</sup>, А. Н. АЛЕКСАНДРОВ<sup>2</sup>,  
А. Ю. МУШКИН<sup>3</sup>, Д. Т. ЛЕВИ<sup>4</sup>, Л. В. СЛОГОЦКАЯ<sup>5</sup>, Е. С. ОВСЯНКИНА<sup>6</sup>,  
Н. В. МЕДУНИЦИН<sup>4</sup>, В. И. ЛИТВИНОВ<sup>5</sup>, М. И. ПЕРЕЛЬМАН<sup>7</sup>, М. А. ПАЛЬЦЕВ<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>НИИ молекулярной медицины ГОУ ВПО ММА им. И. М. Сеченова Росздрава, <sup>2</sup>ЗАО "Мастерклон", <sup>3</sup>ФГУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи", <sup>4</sup>ФГУН Государственный институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л. А. Тарасевича, <sup>5</sup>Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом, Департамента здравоохранения Москвы, <sup>6</sup>ГУ ЦНИИ туберкулеза Российской академии медицинских наук, <sup>7</sup>НИИ фтизиопульмонологии ГОУ ВПО ММА им. И. М. Сеченова Росздрава, Москва

В России уровень заболеваемости и смертности от туберкулеза продолжает оставаться самым высоким среди европейских стран. Показатели заболеваемости составляют более 70 на 100 000 населения, при этом доля детей до 14 лет от общего количества заболевших составляет 3—4%. В этой связи совершенствование методов диагностики этого опасного заболевания при массовых эпидемиологических обследованиях чрезвычайно актуально [3, 6].

Основой специфической профилактики туберкулеза является противотуберкулезная вакцина БЦЖ — аттенуированный штамм *Mycobacterium bovis* BCG. Вакцинация БЦЖ в России при отсутствии противопоказаний осуществляется при рождении ребенка, в 7- и 12-летнем возрасте [5].

Ежегодно для диагностики туберкулезной инфекции и оценки риска развития туберкулеза детям и подросткам проводится кожный туберкулиновый тест (КТТ, реакция Манту). Основным реагентом КТТ является туберкулин (ППД-Л, Purified Protein Derivate — А. А. Линниковой) — белковый экстракт, получаемый в результате очистки инактивированной культуры *M. tuberculosis* [5].

В связи с перекрестной сенсibilизацией организма вакцинным штаммом *M. bovis* BCG и *M. tuberculosis* при инфицировании положительный КТТ может быть в

обоих случаях, что затрудняет его интерпретацию, приводит к гипердиагностике туберкулеза и как результат в некоторых случаях — необоснованному назначению превентивной химиотерапии. Кроме того, положительный результат реакции Манту может быть обусловлен рядом других причин: инфицированностью нетуберкулезными микобактериями за счет наличия общих микобактериальных антигенов, аллергической реакцией организма, поскольку туберкулин является аллергеном, возрастом, гормональным фоном, недавно перенесенными инфекциями и другими причинами. Таким образом, количество ложноположительных реакций КТТ по оценкам специалистов составляет от 40 до 90% [2]. При этом всех подростков с положительной реакцией КТТ отправляют на дополнительное обследование в туберкулезные диспансеры. Значительной проблемой также является дифференциальная диагностика туберкулеза и поствакцинальных осложнений, в частности таких, как БЦЖ-оститы.

Одним из направлений оптимизации диагностики туберкулезной инфекции является использование антигенов *M. tuberculosis*, которые отсутствуют у вакцинного штамма *M. bovis* BCG [1, 4, 14, 24, 30]. Расшифровка и сравнительный анализ геномов разных видов микобактерий, позволили выделить у *M. tuberculosis* область RD1

(region of difference), которая отсутствует у *M. bovis* BCG и большинства непатогенных микобактерий. В этой области *M. tuberculosis*, в частности, кодирует синтез двух секреторных белков ESAT-6 (early secreted antigenic target) и CFP-10 (culture filtrate protein) [7–9, 11, 13, 15, 18, 20, 29]. Возможность использования синтетических белков ESAT-6 и CFP-10 в качестве реагентов для детекции туберкулеза была детально изучена в лабораториях США, Германии, Дании и других стран. Исследования показали, что синтетические пептиды ESAT-6 и CFP-10 выявляют гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ), при инфицировании *M. tuberculosis*, и не дают реакции у вакцинированных БЦЖ [10, 12, 16, 17, 21–23, 25–28, 31, 32].

В лаборатории биотехнологии НИИ молекулярной медицины ММА им. И. М. Сеченова совместно с ЗАО "Мастерклон" был разработан новый реагент для кожного теста, получивший название ДИАСКИНТЕСТ® для скрининговой диагностики туберкулезной инфекции.

Работы по изучению препарата проводили в НИИ молекулярной медицины и НИИ фтизиопульмонологии ММА им. И. М. Сеченова, ФГУН Государственный институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича, НИИ туберкулеза Российской академии медицинских наук, Московским городским научно-практическим центром борьбы с туберкулезом, ФГУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи.

## Материалы и методы

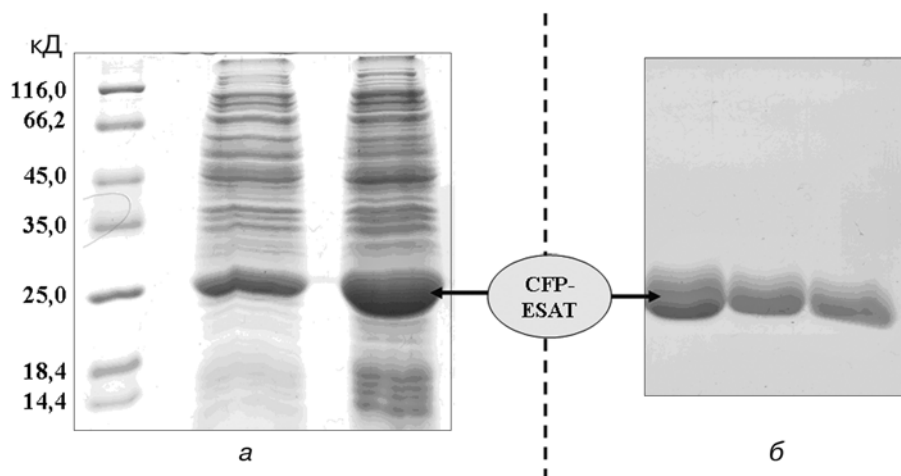
**Характеристика препарата.** Препарат ДИАСКИНТЕСТ® (ДСТ) представляет собой рекомбинантный белок CFP-10/ESAT-6, продуцируемый *Escherichia coli* DLT 1270 (производное штамма DH10B, имеющего

ген *lacI* в хромосоме). Гены CFP-10 и ESAT-6 были амплифицированы на ДНК *M. tuberculosis* H37Rv с помощью праймеров: CFP-F — gc gga tcc gat gac gat gac aaa gca gag atg aag acc gat gc и CFP-R — tca ggt acc gaa gcc cat ttg cga gga ca; ESAT-F — gg ggt acc gat gac gat gac aaa aca gag cag cag tgg aat ttc и ESAT-R — ccc aag ctt cta tgc gaa cat ccc agt ga. Полученные фрагменты были клонированы в плазмидный вектор pQE30 (Qiagen), позволяющий экспрессировать белки с добавлением 6 гистидиновых оснований (HIS) на N-конце.

Рекомбинанты отбирали с помощью рестрикционного анализа. Отобранный клон pQE30 — *esat* — *cfp* обеспечивал синтез гибридного белка ESAT/CFP ожидаемого размера (около 27 кДа; см. рисунок).

ДСТ в виде раствора, содержащего 0,2 мкг в 0,1 мл изготовленного ЗАО Фармацевтическая фирма "Лекко" (Россия), был предоставлен для проведения исследования. Препарат хранился при температуре от 4 до 8°C.

Доклинические исследования препарата ДИАСКИНТЕСТ® — проведены на 315 лабораторных животных (белые мыши, морские свинки) в соответствии с требованиями стандарта GLP (Good Laboratory Practice, Надлежащая лабораторная практика). Доклинические испытания препарата прошли в соответствии с требованиями РД 42-28-8—89 "Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов. Основные положения", санитарными правилами СП



Экспрессия гибридного белка CFP—ESAT в клетках *E. coli* (а); очищенный препарат гибридного белка (б).

Критерии включения и исключения из исследования испытуемых

| Критерии включения в исследование   | Критерии исключения из исследования  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● Взрослые, подростки, дети, больные туберкулезом органов дыхания</li> <li>● Подростки и дети с виражом туберкулиновой пробы</li> <li>● Дети с осложнениями на вакцинацию БЦЖ (больные с БЦЖ-оститами)</li> <li>● Взрослые, подростки и дети, у которых исключен активный туберкулезный процесс</li> <li>● Отрицательный тест на беременность у женщин детородного возраста</li> <li>● Информированное согласие на участие в исследовании</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Наличие беременности и кормления грудью</li> <li>● Индивидуальная непереносимость исследуемых препаратов</li> <li>● Повторное включение испытуемого в исследование</li> <li>● Участие испытуемого в других исследованиях</li> </ul> |

3.3.2.561—96 "Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов" и требованиями Государственного фармакологического комитета.

Препарат прошел испытания на подлинность, стерильность, пирогенность, острую и хроническую токсичность, сенсибилизирующие свойства, специфическую безвредность (шоковая реакция), специфичность. В препарате определены содержание белка и его молекулярная масса. С учетом того что препарат генно-инженерный, подтверждена стабильность штамма-продуцента (ограниченный объем статьи не позволяет привести все протоколы доклинических исследований).

В результате установлено, что препарат ДСТ нетоксичен, не обладает сенсибилизирующими свойствами, безопасен, специфичен, не вызывает положительных реакций у животных, вакцинированных БЦЖ, и у здоровых морских свинок. Его специфическая активность сопоставима со специфической активностью Национального стандарта (ОСО — отраслевой стандартный образец) очищенного туберкулина ППД Л. С нарастанием туберкулез-

ных поражений у морских свинок и ГЗТ увеличиваются ответные реакции на разведения ДСТ, а у вакцинированных БЦЖ животных с нарастанием ГЗТ ответные реакции на ДСТ отсутствуют.

В опытах на животных была установлена оптимальная доза ДСТ 0,2 мкг, которая соответствовала ответным кожным реакциям на стандартный туберкулин 2 ТЕ ППД Л.

Материалы доклинического изучения препарата ДСТ, его антигенной активности и специфичности дали основание рекомендовать его для ограниченных клинических испытаний на добровольцах и проведения в дальнейшем государственных полевых испытаний.

**Дизайн исследования.** Перекрестное, сравнительное с туберкулиновым кожным тестом (КТТ), многоцентровое, открытое клиническое исследование чувствительности и специфичности препарата ДСТ, частоты избыточно сильных реакций и неспецифической аллергии на препарат.

Обследовано 150 человек (взрослые — 31 человек, в возрасте от 18 до 50 лет; подростки и дети — 119 человек) по протоколу

Таблица 2

Характеристика обследованных лиц

| Группа | Характеристика обследованных  | Всего | Взрослые | Подростки и дети |
|--------|---|-------|----------|------------------|
| 1-я    | Больные туберкулезом органов дыхания  | 59    | 18       | 41               |
| 2-я    | Больные туберкулезом легких с выраженными иммунопатологическими нарушениями, обусловленными тяжелым течением туберкулезного процесса и (или) сопутствующими заболеваниями   | 7     | 7        |                  |
| 3-я    | Больные туберкулезом органов дыхания, завершившие терапию противотуберкулезными препаратами, с признаками разрешения процесса (отсутствие симптомов туберкулезной интоксикации, отрицательные результаты посевов мокроты на <i>M. tuberculosis</i> , положительная динамика рентгенологических данных и лабораторных показателей) | 15    | 3        | 12               |
| 4-я    | Пациенты без активности туберкулезного процесса в легких по результатам клиничко-рентгенологических, лабораторных данных, бактериологического исследования мокроты  | 7     | 3        | 4                |
| 5-я    | Дети и подростки с виражом КТТ без данных, подтверждающих органичный туберкулез   | 13    |          | 13               |
| 6-я    | Дети и подростки, у которых положительный КТТ наблюдался на протяжении предыдущих нескольких лет при отсутствии других данных, подтверждающих туберкулезную инфекцию  | 29    |          | 29               |
| 7-я    | Дети с осложнениями на вакцинацию БЦЖ (больные БЦЖ-оститами)  | 20    |          | 20               |

Оценка результатов ДСТ и КТТ через 72 ч

| Результат     | КТТ (согласно инструкции по применению теста в России)   | ДСТ (по результатам 1-й и 2-й фаз клинических исследований)   |
|---------------|--|---|
| Отрицательный | Полное отсутствие инфильтрата (папулы) или гиперемии   | Отсутствие инфильтрата и (или) гиперемии  |
| Сомнительный  | При инфильтрате 2—4 мм или только гиперемии любого размера без инфильтрата   | Гиперемия (любого размера) без инфильтрата или инфильтрат размером 2—4 мм   |
| Положительный | Наличие инфильтрата 5 мм и более.<br>Слабopоложительный — инфильтрат 5—9 мм; средней интенсивности — 10—14 мм; выраженный — 15—16 мм; гиперергический у детей и подростков — 17 мм и более, у взрослых — 21 мм и более, а также при везикулонекротических реакциях с лимфангоитом или без него | Наличие инфильтрата размером 5 мм и более; При размере инфильтрата 15 мм и более, при везикулонекротических изменениях и (или) лимфангоите, лимфадените независимо от размера инфильтрата реакция на препарат считается гиперергической |

исследования согласно критериям включения и исключения (табл. 1).

Диагностика туберкулеза основывалась на оценке симптомов болезни, обнаружении *M. tuberculosis*. Диагноз туберкулеза был поставлен у взрослых при наличии клинико-рентгенологических проявлений болезни и обнаружении *M. tuberculosis*. У большинства подростков и детей диагноз туберкулеза устанавливался на основании клинико-рентгенологических данных и эффективности противотуберкулезной терапии. Критериями клинико-лабораторной диагностики БЦЖ-оститов явились документально подтвержденный факт вакцинации БЦЖ в роддоме, отсутствие указаний на контакт с больными туберкулезом и других локализаций специфического процесса, появление первых признаков заболевания в возрасте до 3 лет, наличие ограниченных деструктивных костных очагов, выявление специфических изменений при гистологическом исследовании удаленного патологического материала, отсутствие выделения культуры *M. tuberculosis* или выделение *M. bovis* BCG при бактериологическом исследовании хирургического материала.

При проведении исследования сформированы 7 групп обследуемых (табл. 2).

**Постановка пробы с препаратом ДСТ и КТТ.** Обученная медицинская сестра проводила двойной тест на обеих руках (внутренняя поверхность средней трети предплечий) с помощью одноразовых туберкулиновых шприцев. В кожу правого предплечья вводили 0,1 мл (0,2 мкг) ДСТ, в кожу левого предплечья — 0,1 мл (2ТЕ) очищенного туберкулина. Наблюдение за общей и местной реакцией осуществляли после введения препаратов в течение 72 ч.

Используемая оценка результатов представлена в табл. 3.

**Статистическая обработка данных.** В исследовании определяли точные доверительные интервалы доли, биномиальное распределение, доверительный интервал для разницы долей, непараметрический аналог дисперсионного анализа повторных измерений [19].

**Этические нормы проведения исследований.** Клиническое исследование одобрено Комитетом по этике при Федеральном органе контроля качества лекарственных средств, Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития Российской Федерации и выполнялось после получения от исследуемых и родителей детей, участвующих в исследовании, письменного информированного согласия.

**Клинические исследования.** В 1-й и 2-й фазах клинических исследований на 70 взрослых добровольцах (20 — здоровых и 50 — больных туберкулезом легких) показана безопасность ДСТ. Проба с ДСТ была положительной у больных туберкулезом легких, отрицательной у здоровых лиц. При разведении препарата ДСТ 0,2 мкг в 0,1 мл отмечена максимальная чувствительность теста при минимальной частоте избыточно сильных реакций.

3-я фаза клинических исследований была проведена после экспертизы результатов 1-й и 2-й фаз клинических исследований, лабораторного контроля экспериментально-производственных серий препарата ДСТ, страхования ответственности за вред, причиненный здоровью пациентов при проведении клинических исследований, гражданской ответственности лиц, осуществляющих проведение клиниче-

ских исследований. Клиническое исследование разрешено Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

## Результаты и обсуждение

Чувствительность ДСТ изучена у 72 человек (взрослые, подростки, дети больные туберкулезом органов дыхания — 59; подростки и дети с виражом КТТ без данных об органном туберкулезе — 13 человек). У всех обследованных проба с препаратом ДСТ была положительной. Доверительный интервал положительного результата с ДСТ, основанный на биномиальном распределении, составил: верхняя граница 1,0; нижняя — 0,98 ( $p < 0,05$ ). У больных туберкулезом с выраженными иммунопатологическими нарушениями (2-я группа), обусловленными тяжелым течением туберкулезного процесса у 1 больного и сопутствующими заболеваниями (ВИЧ, гепатит С, В и др.) у 6 больных, кожная реакция на ДСТ отсутствовала у 4 и была положительной у 3 больных. У всех детей и подростков, больных туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов и с виражом КТТ, отмечалась выраженная реакция на ДСТ. При этом везикуло-некротические изменения, лимфангоит, лимфаденит среди лиц с положительной реакцией на ДСТ встречаются в доверительном интервале от 2 до 14% ( $p < 0,05$ ).

Специфичность ДСТ изучена у 29 детей и подростков, у которых положительный КТТ наблюдался на протяжении предыду-

щих нескольких лет при отсутствии других данных о туберкулезной инфекции (6-я группа), и у 7 пациентов (взрослые, подростки, дети) без признаков активности туберкулезного процесса по результатам клинико-рентгенологических, лабораторных данных, бактериологического исследования мокроты (4-я группа). Отрицательный результат получен у 34 из 36, у 2 реакция была сомнительной (табл. 4). Доверительный интервал доли, основанной на биномиальном распределении, составил для данного объема выборки 0,9—1,0 ( $p < 0,05$ ).

Особое значение в клиническом исследовании имело изучение специфичности пробы с ДСТ у лиц с ГЗТ, связанной с вакцинацией БЦЖ (7-я группа). У всех обследованных больных с БЦЖ-оститами проба с ДСТ оказалась отрицательной, а с КТТ — положительной (см. табл. 4).

Сравнительный анализ результатов исследования с препаратом ДСТ и КТТ показал, что при активном туберкулезном процессе (1-я группа) у взрослых, детей и подростков, а также у детей и подростков с виражом КТТ степень выраженности положительной пробы с ДСТ достоверно ( $p < 0,01$ ) выше, чем при КТТ (см. табл. 4). В период разрешения туберкулезного процесса (3-я группа) реакция на препарат ДСТ достоверно ( $p < 0,001$ ) менее выражена, чем при КТТ.

Ложноположительный и сомнительный результаты КТТ у обследованных 6-й и 4-й групп наблюдались в 33 из 36 наблюдений. Сомнительный результат с ДСТ отмечен у 2 пациентов 6-й группы (см. табл. 4). Доверительный интервал для разницы долей составил 0,65—0,99 ( $p < 0,05$ ), т. е. при использовании пробы с ДСТ количество ложноположительных и сомнительных реакций, наблюдаемых при КТТ, снижается на 65—99%.

По результатам клинических исследований установлено, что ДСТ в разведении 0,2 мкг в 0,1 мл обладает высокой чувствительностью и специфичностью при минимальной частоте избыточно сильных реакций. У больных туберкулезом с выраженными иммунопатологическими нару-

Таблица 4  
Результаты ДСТ и КТТ в исследуемых группах

| Группа | Результат проб |              |               |               |              |               |
|--------|----------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
|        | ДСТ            |              |               | КТТ           |              |               |
|        | положительный  | сомнительный | отрицательный | положительный | сомнительный | отрицательный |
| 1-я    | 59*            |              |               | 59            |              |               |
| 2-я    | 3              |              | 4             | 2             |              | 5             |
| 3-я    | 10**           |              | 5             | 15            |              |               |
| 4-я    |                |              | 7             | 5             | 1            | 1             |
| 5-я    | 13*            |              |               | 13            |              |               |
| 6-я    |                | 2            | 27            | 24            | 3            | 2             |
| 7-я    |                |              | 20            | 20            |              |               |

Примечание. \* — реакция на ДСТ более выраженная ( $p < 0,05$ ) по сравнению с КТТ; \*\* — реакция на ДСТ менее выраженная ( $p < 0,05$ ) по сравнению с КТТ.

шениями, обусловленными тяжелым течением туберкулезного процесса и (или) сопутствующими заболеваниями (ВИЧ и др.), кожная реакция на ДСТ, как и на КТТ, может отсутствовать. У лиц с ГЗТ, связанной с вакцинацией БЦЖ, реакция на препарат ДСТ отсутствует.

Сравнительное изучение проб с препаратом ДСТ и КТТ подтверждают положения о том, что положительные результаты КТТ как проявление поствакцинальной и (или) неспецифической аллергии вносят значительную неопределенность в процесс диагностики туберкулезной инфекции. Преимущества ДСТ обоснованы его высокой специфичностью и чувствительностью, что позволяет более качественно диагностировать туберкулезную инфекцию, а в комплексе с другими методами более объективно оценивать активность процесса и его динамику.

#### Выводы

1. ДИАСКИНТЕСТ® в дозе 0,2 мкг в 0,1 мл вызывает у больных туберкулезом (активный процесс) и лиц, впервые инфицированных микобактериями туберкулеза, положительную кожную реакцию (папула более 10 мм) в доверительном интервале от 98 до 100% наблюдений ( $p < 0,05$ ).

2. Специфичность теста находится в доверительном интервале от 90 до 100% ( $p < 0,05$ ). Препарат не вызывает реакции, связанной с вакцинацией БЦЖ.

3. Избыточно сильные реакции (везикуло-некротические изменения, лимфангоит, лимфаденит) наблюдаются в доверительном интервале от 2% до 14% ( $p < 0,05$ ).

4. У больных туберкулезом с выраженными иммунопатологическими нарушениями, кожная чувствительность к препарату ДИАСКИНТЕСТ®, как и к ППД Л, может отсутствовать (отрицательная проба).

5. Неспецифической аллергии на ДИАСКИНТЕСТ® не выявлено.

Полученные результаты обосновывают предназначение препарата ДИАСКИНТЕСТ® с целью:

● диагностики туберкулеза и оценки активности процесса;

● дифференциальной диагностики туберкулеза;

● дифференциальной диагностики поствакцинальной и инфекционной аллергии (гиперчувствительности замедленного типа);

● наблюдения за эффективностью лечения в комплексе с другими методами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Киселев В. И., Северин Е. С., Перельман М. И., Пальцев М. А. Новые биотехнологические решения в диагностике и профилактике туберкулезной инфекции // Вестн. НИИ молекул. мед. — 2005. — Вып. 5. — С. 37—45.
2. Лебедева Л. В., Грачева С. Г. Чувствительность к туберкулину и инфицированность микобактериями туберкулеза у детей // Пробл. туб. — 2007. — № 1. — С.
3. Медведев С. Ю., Перельман М. И. Туберкулез в России // Туберкулез и вакцинопрофилактика. — 2002. — № 1 (19). — С.
4. Перельман М. И., Хомяков Ю. Н., Киселев В. И. и др. Молекулярная медицина и лечение туберкулеза // Пробл. туб. — 2001. — № 5. — С. 5—8.
5. Санитарно-эпидемиологические правила "Профилактика туберкулеза. СП 3.1.1295-03", утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 18 апреля 2003 г. — М., 2003.
6. Цыбикова Э. Б., Сон И. М. Динамика показателей заболеваемости и смертности от туберкулеза в России в 2005 г. // Пробл. туб. — 2007. — № 3. — С.
7. Andersen P., Munk M. E., Pollock J. M., Doherty T. M. Specific immunebased diagnosis of tuberculosis // Lancet. — 2000. — Vol. 356, N 9235. — P. 1099—1104.
8. Arend S. M., Ottenhoff T. H. et al. Uncommon presentation of tuberculosis the potential value a novel diagnostic assay based on the Mycobacterium tuberculosis-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 // Int. J. Tubercul. Lung Dis. — 2001. — Vol. 5, N 7. — P. 680—686.
9. Berthet F. X., Rasmussen P. B., Rosenkrands I. et al. Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecularmass culture filtrate protein (CFP-10) // Microbiology. — 1998. — Vol. 144, Pt 11. — P. 3195—3203.
10. Betty A., Wu Hsieh, Chung-Kwahg Chen et al. Long-live immune response to early secretory antigenic target in individual who had recovered from tuberculosis // Clin. Infect. Dis. — 2001. — Vol. 33. — P. 1336—1340.

11. Brock I., Munk M. E., Kok-Jensen A., Andersen P. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10 // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* — 2001. — Vol. 5, N 5. — P. 462–467.
12. Brodin P., Jonge M. I., Majlessi L. et al. Functional analysis of early secreted antigenic target-6, the dominant T-cell antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, reveals key residues involved in secretion, complex formation, virulence, and immunogenicity // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280, N 40. — P. 33953–33959.
13. Brosch R., Gordon S. V., Billault A. et al. Use of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics // *Infect. and Immun.* — 1998. — Vol. 66. — P. 2221–2229.
14. Brusasca P. N., Colongeli R. et al. Immunological characterization of antigens encoded by the RD1 region of the *M. tuberculosis* genome // *Scand. J. Immunol.* — 2001. — Vol. 54, N 5. — P. 448–452.
15. Cole S. T., Brosch R., Parkhill J. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence // *Nature.* — 1998. — Vol. 393, N 11. — P. 537–544.
16. Doherty T. M., Demissie A. et al. Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients // *J. Clin. Microbiol.* — 2002. — Vol. 40, N 2. — P. 704–706.
17. Ferrara G., Losi M., D'Amico R. et al. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study // *Lancet.* — 2006. — Vol. 367. — P. 1328–1334.
18. Gennaro M. L. Immunologic diagnosis of tuberculosis // *Clin. Infect. Dis.* — 2000. — Vol. 30. — Suppl. 1. — P. 243–246.
19. Glantz S. A. *Primer of Biostatistics.* — New York, 2001.
20. Harboe M., Oettinger T., Wiker H. G. et al. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG // *Infect. and Immun.* — 1996. — Vol. 64. — P. 16–22.
21. Houghton R. L., Lodes M. J., Dillon D. C. et al. Use of multi-epitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 2002. — Vol. 9, N 4. — P. 883–891.
22. Lein A. D., Fordham von Reyn C., Ravn P. et al. Cellular immune responses to ESAT-6 discriminate between patients with pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex and those with pulmonary disease due to *Mycobacterium tuberculosis* // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 1999. — Vol. 6, N 4. — P. 606–609.
23. Lyashchenko K., Colangeli R., Houde M. et al. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis // *Infect. and Immun.* — 1998. — Vol. 66, N 8. — P. 3936–3940.
24. Meier T., Eulenbruch H. P., Wrighton-Smith P. et al. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* — 2005. — Vol. 24. — P. 529–536.
25. 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. — Vol. 146. — P. 340–354.
26. Munk M. E., Arend S. M., Brock I. et al. Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis // *J. Infect. Dis.* — 2001. — Vol. 183, N 1. — P. 175–176.
27. Ravn P., Munk M. E., Andersen A. B. et al. Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 2005. — Vol. 12, N 4. — P. 491–496.
28. Renshaw P. S., Panagiotidou P., Whelan A. et al. Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6\*CFP-10 complex. Implications for pathogenesis and virulence // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277, N 24. — P. 21598–21603.
29. Skjot R., Oettinger T., Rosenkrands I. et al. Comparative evaluation of low-molecular-mass T-cell antigens from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant // *Infect. and Immun.* — 2000. — Vol. 68. — P. 214–220.
30. Teixeira H. C., Abramo C., Munk M. E. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success // *J. Bras. Pneumol.* — 2007. — Vol. 33, N 3. — P. 323–334.
31. Weldingh K., Andersen P. ESAT-6/CFP-10 skin test predicts disease in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs // *PLoS ONE.* — 2008. — Vol. 3, N 4. — P. e1978.
32. Wu X., Zhang L., Zhang J. et al. Recombinant early secreted antigen target 6 protein as a skin test antigen for the specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection // *Clin. Exp. Immunol.* — 2008. — Vol. 152, N 1. — P. 81–87.

Поступила 25.10.08

*В. И. Киселев, П. М. Барановский, И. В. Рудых, А. М. Шустер, В. А. Мартыанов, Б. Л. Медников, А. В. Демин, А. Н. Александров, А. Ю. Мушкин, Д. Т. Леви, Л. В. Слогоцкая, Е. С. Овсянкина, Н. В. Медуницын, В. И. Литвинов, М. И. Перельман, М. А. Пальцев.* — КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НОВОГО КОЖНОГО ТЕСТА ДИАСКИНТЕСТ® ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Разработан новый реагент для кожного теста, получивший название Диаскинтест® для скрининговой диагностики туберкулеза и проведены доклинические и клинические испытания нового препарата. Доклинические испытания проведены на 315 лабораторных животных (морские свинки, белые мыши). В результате установлено, что препарат Диаскинтест® нетоксичен, не обладает сенсибилизирующими свойствами, безопасен, специфичен, не вызывает положительных реакций у животных, вакцинированных БЦЖ, и у здоровых морских свинок. Его специфическая активность сопоставима со специфической активностью Национального стандарта очищенного туберкулина ППД Л-2. С нарастанием туберкулезных поражений у морских свинок увеличиваются ответные реакции на разведение Диаскинтеста®, а у вакцинированных БЦЖ животных с нарастанием гиперчувствительности замедленного типа ответные реакции на Диаскинтест® отсутствуют.

Клиническое исследование разрешено Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Клинические исследования проведены у 150 человек. Впервые в клинических исследованиях была изучена безопасность, специфичность, чувствительность препарата Диаскинтест® и проведено сравнение его действия с результатами кожного туберкулинового теста (реакция Манту) с 2 ТЕ ППД Л-2. Установлена высокая чувствительность препарата Диаскинтест® в дозе 0,2 мкг в 0,1 мл. Препарат вызывает у больных туберкулезом (активный процесс) и лиц, впервые инфицированных микобактериями туберкулеза, положительную кожную реакцию (папула более 10 мм) в 98—100% наблюдений ( $p < 0,05$ ). Препарат не вызывает реакции, связанной с вакцинацией БЦЖ. Специфичность теста составляет 93—100% при 95% достоверности. Частота избыточно сильных реакций (везикулонекротические изменения, лимфангоит, лимфаденит) составляет 2—14% ( $p < 0,05$ ). У больных туберкулезом с выраженными иммунопатологическими нарушениями кожная чувствительность к препарату Диаскинтест®, как и к ППД Л-2, может отсутствовать (отрицательная проба). Полученные результаты обосновывают применение препарата Диаскинтест® для массовых эпидемиологических обследований населения с целью дифференциальной диаг-

ности туберкулеза и осложнений, связанных с вакцинацией БЦЖ. Препарат может быть использован также для оценки активности процесса у больных туберкулезом и эффективности лечения в комплексе с другими методами, дифференциальной диагностики туберкулеза.

*V. I. Kiselev, P. M. Baranovsky, I. V. Rudykh, A. M. Shuster, V. A. Martyanov, B. L. Mednikov, A. V. Demin, A. N. Aleksandrov, A. Yu. Mushkin, D. T. Levi, L. V. Sligotskaya, Ye. S. Ovsyankina, N. V. Medunitsyn, V. I. Litvinov, M. I. Perelman, M. A. Paltsev.* — CLINICAL TRIALS OF THE NEW SKIN TEST DIASKINTEST® FOR THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

A new reagent for a skin test given the name Diaskintest® has been designed for the screening diagnosis of tuberculosis and preclinical and clinical trials conducted. Preclinical trials were carried out on 315 laboratory animals (guinea-pigs, albino mice). The reagent Diaskintest® was ascertained to be nontoxic, to have no sensitizing properties, to be safe and specific, and to induce no positive reactions in BCG-vaccinated animals and healthy guinea-pigs. Its specific activity was comparable with that of the national reference - purified tuberculin PPD-L-2. With progression of tuberculous lesions, the guinea-pigs showed higher responses to Diaskintest® dilution and the BCG-vaccinated animals lacked responses to Diaskintest® with increased delayed type hypersensitivity.

The clinical trial was permitted by the Federal Service for Surveillance in Health Care and Social Development of the Russian Federation.

Clinical trials were conducted in 150 persons. The safety, specificity, sensitivity of Diaskintest® were first examined in the clinical studies and its action was compared with the results of tuberculin skin test (Mantoux test) with 2 TE of PPD L-2. Diaskintest® was ascertained to be highly sensitive when given in a dose of 0.2  $\mu\text{g}$  in 0.1 ml. In patients with active tuberculosis and new cases of Mycobacterium tuberculosis infection, the agent induced a positive skin reaction (a papule of more than 10 mm) in 98-100% of cases ( $p < 0.05$ ). The agent caused no reaction associated with BCG vaccination. The specificity of the test was 93-100% with 95% significance. The rate of overexuberant reactions (vesicular necrotic changes, lymphangitis, and lymphadenitis) was 4-14% with 95% significance. Tuberculosis patients with significant immunopathological disorders might have no skin sensitivity to Diaskintest®, as to PPD L-2 (a negative test). The findings substantiate the use of Diaskintest® for mass epidemiological surveys for the differential diagnosis of tuberculosis and BCG vaccination-associated complications. The agent may be also used to evaluate the activity of the process in patients with tuberculosis and the efficiency of treatment in combination with other methods and to make a differential diagnosis of tuberculosis.