

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор*

Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент **

Лемиш А.П. *

Архипов И.Н. *

Прокопенкова Т.М. *

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

**УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТУБЕРКУЛИНА ОЧИЩЕННОГО ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ УП «ВИТЕБСКАЯ БИОФАБРИКА» В СРАВНЕНИИ С PPD MYCOBACTERIUM BOVIS 1st INTERNATIONAL STANDARD

На морских свинках инфицированных живым штаммом M.bovis BCG относительно 1st International standard PPD Mycobacterium bovis определена активность двух контрольных серий туберкулина очищенного (УП «Витебская биофабрика»). Установлено, что активность контрольных серий туберкулина очищенного отличалась на 3,6% и, в среднем составила 23600 IU/ml (67,6-79,4 % от стандарта), что соответствует требованиям Европейской Фармакопеи.

Активность ППД туберкулина Курской биофабрики относительно международного стандарта составила около 20000 IU/ml.

Используемая диагностическая доза туберкулина очищенного (УП «Витебская биофабрика») составляет 4391 IU - 5158 IU, что соответствует рекомендуемой дозе при оздоровлении стад от туберкулеза. В багополучных регионах она может быть уменьшена в 2 раза

In experiences on the guinea-pigs infected M.bovis BCG activity of two control lots of tuberculin cleared for mammal («Vitebsk biofactory») be relative 1st International standard PPD Mycobacterium bovis differed only on 3,6 % and has on the average - 23600 IU/ml (67,6-79,4 % from the standard), that corresponds to requirements European Pharmacopoeia.

PPD tuberculin (Kursk biofactory) at comparison with equivalent dilutions 1st International standard PPD Mycobacterium bovis, approximately, makes activity of 20000 IU/ml.

The diagnostic doze of tuberculin cleared for mammal (Vitebsk biofactory) is within the limits of 4391 IU - 5158 IU and correspond to a recommended doze at liquidation of a tuberculosis. With the account concerning favorable situations in republic the diagnostic doze of a preparation in the majority of areas can be reduced in 2 times.

Внутрикожная туберкулиновая проба – основной метод массовой диагностики туберкулеза животных. В последнее время в ряде стран СНГ начато производство туберкулинов, отличающихся по технологии изготовления от широко использовавшегося ППД туберкулина для млекопитающих Курской биофабрики [2, 7, 8, 9].

Обычно, ППД туберкулина получают осаждением туберкулопротеинов из культуральной жидкости после завершения роста возбудителя туберкулеза на жидкой синтетической питательной среде. Считается, что химическое осаждение туберкулопротеинов повышает специфичность и облегчает стандартизацию препарата [11]. Вместе с тем, такая технология существенно не повышает гомогенность белкового и антигенного состава ППД туберкулина [5, 12]. На специфичность препарата больше влияет фракция с массой молекул и более 100 kDa, удаление которой снижает его перекрестную активность у животных, инфицированных нетуберкулезными микобактериями [6]. Этот принцип положен в основу технологии получения «туберкулина очищенного для млекопитающих (ТО), выпускаемого с 2003 г. на УП «Витебская биофабрика», где целевой продукт очищают с помощью ультрафильтрации, отделяющей фракцию с м.м. 300 kDa и более [7].

Первоначально стандартизация ТО проводилась относительно ППД туберкулина для млекопитающих Курской биофабрики [8]. Установлено, что в стандартном разведении ак-

тивность производственных серий ТО - 50000 ± 10000 МЕ\мл в единицах активности старого стандарта ППД туберкулина, что соответствует ГОСТ 16739.

С учетом необходимости гармонизации национальных и международных технических требований целесообразно перейти на стандартизацию туберкулинов относительно 1st International standard Purified protein derivative (PPD) *Mycobacterium bovis* 1986 года, калибруя контрольные серии или национальные стандарты препарата.

Целью работы явилось определение активности контрольных серий ТО в сравнении с 1st International standard Purified protein derivative (PPD) *Mycobacterium bovis* и со стандартным раствором ППД туберкулина для млекопитающих ФГУП «Курская биофабрика».

Материалы и методы исследований

Препараты туберкулинов:

- 1st International standard Purified protein derivative (PPD) *Mycobacterium bovis* (National Institute for Biological Standards and Control UK и Central Veterinary Laboratory, Lion). В ампуле 1,8 мг туберкулопротеинов с общей активностью 58000 IU. В ампулу добавляли 1,8 мл 0,32% раствора фенола, получая раствор с концентрацией 1 мг/мл и активностью 32500 IU/мл. Препараты вводили в объеме 0,2 мл в разведениях 1:200 (0,001 мг/ 0,2 мл, 32 IU), 1:1000 (0,0002 мг/ 0,2 мл, 6,4 IU), 1:5000 (0,00004 мг/ 0,2 мл, 1,28 IU);

- стандартный раствор ППД туберкулина для млекопитающих ФГУП «Курская биофабрика» серии 11, изготовленной 21.07.2006 г.

- ТО УП «Витебская биофабрика» серии №37, 0,53 мг\мл (контрольная серия 2006-2007 гг.);

- ТО УП «Витебская биофабрика» серии №37 серии №50, 0,44 мг\мл (контрольная серия 2007-2009 гг.).

ППД и ТО вводили в объеме 0,2 мл, в разведениях 1:200, 1:1000, 1:5000 на изотоническом растворе с твином 80.

- Морских свинок-альбиносов (n=66) массой 400 г. и более сенсibilизировали внутрикожно вакциной *M.bovis* BCG-1 (НИИЭМ им. Гамалеи РАМН, филиал «Медгамал») в дозе 1 мг на животное. Исследования проводили через 30 суток после введения *M.bovis* BCG.

Результаты исследований

В первой серии опытов определяли активность контрольных серий ТО №37 и №50 в сравнении с PPD BOV AN5, NIBSC (M^1) и PPD *Mycobacterium bovis*, Central Veterinary Laboratory, Lion (M^2), (табл. 1).

На рисунках 1 и 2 по данным таблицы 1 представлена зависимость диаметра папул от логарифма дозы стандарта PPD (верхняя линия) и ТО серии №37, исходя из предположения, что разведения препаратов равны по активности. В первом опыте (M^1) расстояние между линиями активности по оси абсцисс составило 0,1 lg, что соответствует коэффициенту различия 1,26 (antilog 0,1=1,26). Во втором опыте (M^2) -0,17 lg (antilog - 1,48). Таким образом, активность контрольной серии ТО №37 по двум опытам составила $32500 \text{ IU/ml} \div 1,26 = 25793 \text{ IU/ml}$ и $32500 \text{ IU/ml} \div 1,48 = 21959 \text{ IU/ml}$, т.е. различалась на 14,8%, и в среднем, составила 23876 IU/ml.

На рисунке 3 представлена зависимость диаметра папул от логарифма дозы при введении стандарта PPD (верхняя линия) и ТО серии 50. Среднее расстояние между линиями активности по оси абсцисс составило 0,15 lg, что соответствует коэффициенту различия 1,41 (antilog -0,15). Следовательно, активность ТО серии 50 составила $32500 \text{ IU/ml} : 1,41 = 23049 \text{ IU/ml}$.

Таким образом, активность двух контрольных серий ТО, определенная относительно стандарта PPD составила, соответственно, 23876 IU/ml и 23049 IU/ml, т.е. различалась только на 3,6%.

Таблица 1 – Интенсивность аллергических реакций у морских свинок на контрольные серии ТО №37 и №50 в сравнении с 1st International standard PPD Mycobacterium bovis

Морские свинок M. bovis (n=37)	Среднеарифметический диаметр папул в мм через 24 ч					
	ТО			Стандарт PPD		
	1:200	1:1000	1:5000	1:200 32 IU	1:1000 6,4 IU	1:5000 1,28 IU
M ¹ =	15,6	12,3	7,2	16,3	12,5	8,1
M ² =	19,3	14,5	8,3	21,4	16,0	9,7
M ³ =	16,3	12,1	7,5	18,2	11,8	8,0

Сравнивались:

M¹ – ТО серии №37 с 1st International standard PPD BOV AN5, NIBSC;

M² - ТО серии №37 с 1st International standard PPD Mycobacterium bovis Central Veterinary Laboratory, Lion;

M³ – ТО серии №50 с 1st International standard PPD Mycobacterium bovis Central Veterinary Laboratory, Lion.

При непосредственном сравнении ТО серий 37 и 50 (табл. 2, рис. 4) расстояние между линиями активности по оси абсцисс составило 0,06 lg, что соответствует коэффициенту различия 1,148 (antilog 0,06). Следовательно, в данном опыте активность серий ТО различалась на 12,9%.

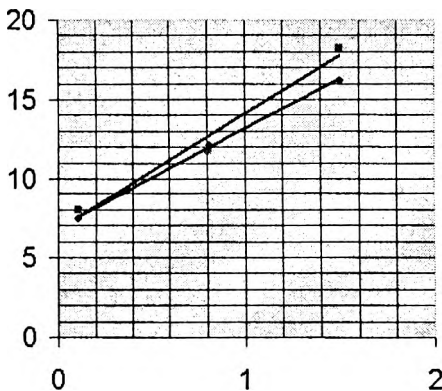
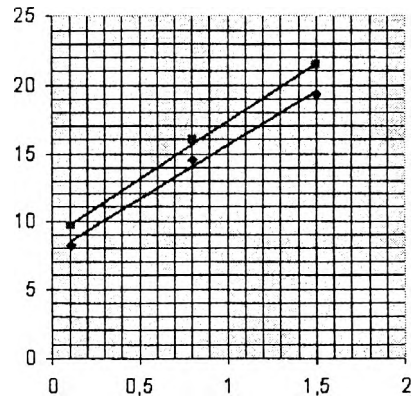
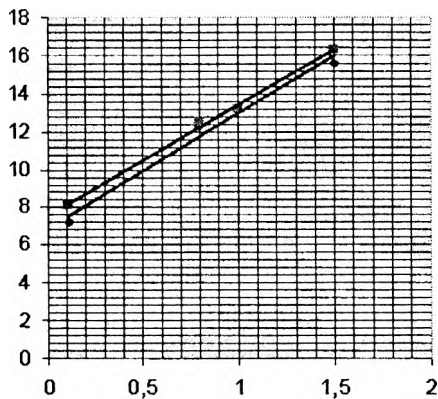


Рисунок 1-3 – Зависимость диаметра папул (ось ординат) от логарифма дозы (ось абсцисс) при введении стандарта PPD (верхняя линия) и туберкулина очищенного серии 37 (рис. 1,2), серии 50 (рис. 3) при условии, что разведения препаратов равны по активности

Таблица 2 – Сравнение активности ТО серий №37 и №50 УП «Витебская биофабрика»

Морские свинки M.bovis (n=10)	Среднеарифметический диаметр папул в мм через 24 ч					
	ТО серии 37			ТО серии 50		
	1:200	1:1000	1:5000	1:200	1:1000	1:5000
M=	16,6	12,0	6,9	16,1	11,1	6,5

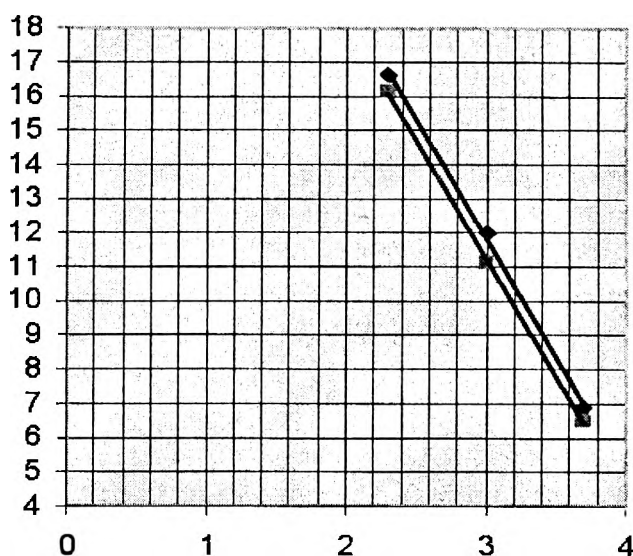


Рисунок 4 – Зависимость диаметра папул от логарифма разведения ТО серий №37 (верхняя линия) и №50

Результаты сравнения активности стандартного раствора ППД туберкулина для млекопитающих ФГУП «Курская биофабрика с 1st International standard PPD Mycobacterium bovis, Central Veterinary Laboratory приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Сравнение активности стандартного раствора ППД туберкулина ФГУП «Курская биофабрика с 1st International standard PPD Mycobacterium bovis

Морские свинки M.bovis (n=10)	Среднеарифметический диаметр папул в мм через 24 ч					
	ППД туберкулин серии 11			1st International standard PPD M. bovis, Central Veterinary Laboratory		
	1:200	1:1000	1:5000	1:200 32 IU	1:1000 6,4 IU	1:5000 1,28 IU
M=	16,3	12,1	6,5	17,8	13,8	8,3

На рисунке 5 представлена зависимость эффекта (диаметра папул) от логарифма дозы международного стандарта PPD (верхняя линия) и ППД туберкулина серии 11. Среднее расстояние между линиями активности по оси абсцисс составляет 0,23 log, что соответствует коэффициенту различия 1,698 (antilog 0,23). Следовательно, активность ППД туберкулина серии 11 относительно международного стандарта составляет 32500IU/ml: 1,698=19140 IU/мл.

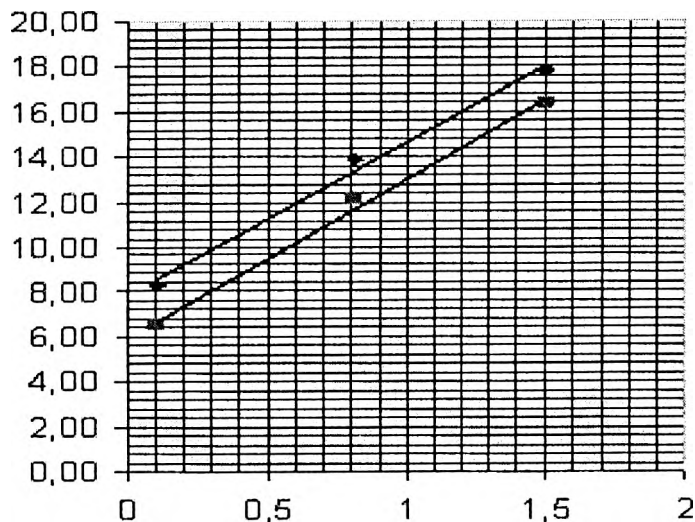


Рисунок 5 – Зависимость эффекта (диаметра папул) от логарифма дозы при введении международного эталона PPD (верхняя линия) и ПД туберкулина серии 11 ФГУП «Курская биофабрика»

При сравнении активности ТО серии 50 и стандартного раствора ПД туберкулина для млекопитающих ФГУП «Курская биофабрика» серии 11 (табл.4, рис.6) установлено, что максимальное расстояние между линиями активности по оси абсцисс составляло 0,04 lg, что соответствует коэффициенту различия 1,1 (antilog 0,04). В разведении 1:200 линии активности препаратов, практически совпадали. Следовательно, активность ТО серии 50 составляла 100-110% активности ПД туберкулина ФГУП «Курская биофабрика».

В таблице 5 суммированы результаты определения активности изученных препаратов, которая была в пределах 19000-25000 IUмл в единицах активности 1st International standard PPD Mycobacterium bovis.

Таблица 4 – Сравнение активности стандартного раствора ПД туберкулина ФГУП «Курская биофабрика с ТО серии 50

Морские свинки M.bovis (n=9)	Среднеарифметический диаметр папул в мм через 24 ч					
	ПД туберкулин серии 11			ТО серии 50		
	1:200 50ME	1:1000 10ME	1:5000 2 ME	1:200	1:1000	1:5000
M=	14,8	9,7	5,3	14,7	10,3	5,9

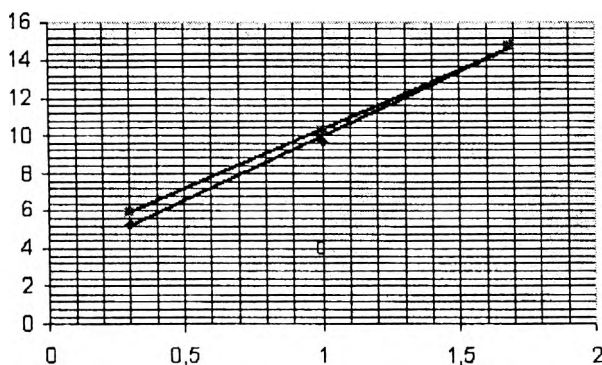


Рисунок 6 – Зависимость диаметра папул от логарифма разведения ТО серии №50 (верхняя линия) и ПД туберкулина серии 11, принимая, что препараты равны по активности

Таблица 5 – Активность контрольных серий ТО и стандартного раствора ППД туберкулина для млекопитающих ФГУП «Курская биофабрика»

Препараты, относительно которых определялась активность	Определенная активность IU/мл, % от стандарта		
	ТО серии 37	ТО серии 50	ППД туберкулин ФГУП «Курская биофабрика» серии 11
1 st International standard PPD BOV AN5, NIBSC	25793 (79,4%)		
1 st International standard, Central Veterinary Laboratory, Lion	21959 (67,6%)	23049 (71%)	19140

Обсуждение результатов

Известно, что проявление активности туберкулинов зависит от многих факторов, и может, в зависимости от условий опыта, отличаться на 20-40% [13]. По European Pharmacopoeia активность бычьих туберкулинов не должна быть меньше 66% и более, чем 150% стандарта [13]. Согласно полученным результатам относительно стандарта PPD активность контрольных серий ТО составила – 67,6-79,4%, что соответствует указанным выше требованиям.

Сравнение двух контрольных серий ТО относительно стандарта PPD показало, что они корректно стандартизированы по активности, которая различалась только на 3,6%. Определенный интерес вызывают результаты сопоставления активности ППД туберкулина ФГУП «Курская биофабрика» с международным стандартом. Ранее было установлено, что она составляет порядка 10000 IU/мл [3,4]. При расчете активности ППД исследователи исходили из равенства единиц активности ППД туберкулина Курской биофабрики и международного стандарта. На наш взгляд, корректнее определять активность стандартного раствора препарата используемого для массовой диагностики, делая разведения эквивалентные разведениям стандарта. При такой методике расчета активность ППД туберкулина ФГУП «Курская биофабрика» оказалась в 2 раза выше (около 20000 IU/мл).

По рекомендации OIE Manual (2004) в благополучных странах диагностическая доза туберкулина для крупного рогатого скота должна быть в пределах 2000 IU (+/-25%), а при проведении мероприятий по оздоровлению - 5000 IU в единицах активности 1st International standard PPD 1986 г.. Исходя из полученных результатов, диагностическая доза ТО находится в пределах 4391 IU - 5158 IU, и соответствует дозе, применяемой при ликвидации туберкулеза. Учитывая относительно благоприятную эпизоотическую ситуацию по туберкулезу крупного рогатого скота в республике, доза ТО может быть уменьшена в 2 раза (т.е. до 5000 ME в единицах старого стандарта), что сократит число ложноположительных реакций (на 14-32%) [1] без ущерба выявления животных, инфицированных возбудителем туберкулеза.

Выводы

1. В опытах на морских свинках, зараженных *M.bovis* БЦЖ активность контрольных серий туберкулина очищенного для млекопитающих УП «Витебская биофабрика» 2006-2007 г. и 2007-2009 г. относительно 1st International standard PPD *Mycobacterium bovis* различалась только на 3,6% и в среднем составила 23600 IU/мл (67,6-79,4% от стандарта), что соответствует требованиям European Pharmacopoeia.

2. Активность стандартного раствора ППД туберкулина ФГУП «Курская биофабрика» при сравнении с эквивалентными разведениями 1st International standard PPD *Mycobacterium bovis*, примерно, составляет 20000 IU/мл.

3. Диагностическая доза туберкулина очищенного для млекопитающих УП «Витебская биофабрика» находится в пределах 4391 IU - 5158 IU и соответствует рекомен-

дусмой дозе при ликвидации туберкулеза. С учетом относительно благоприятной эпизоотической ситуации в республике диагностическая доза препарата в большинстве районов может быть уменьшена в 2 раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Донченко, А.С. Мероприятия по дифференциации парааллергических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота и их экономическая эффективность / А.С. Донченко, Ю.И. Смолянинов, В.А. Сысоев // Сб. науч. тр. / ВАСХНИЛ. Сиб. отделение ИЭВСиДВ. – Новосибирск, 1985. – С. 34–38.
2. Козлов, В.Е. Оценка активности и специфичности коммерческих мерий туберкулина (ППД) для млекопитающих отечественного и зарубежного производства / В.Е. Козлов, Н.К. Букина, А.Х. Найманов // Ветеринарная патология. – 2004. – № 1-2. – С. 82-85.
3. Оценка активности национального стандарта туберкулина (ППД) для млекопитающих относительно 1-го международного стандарта туберкулина (PPD) bovine / В.Е. Козлов [и др.] // Ветеринарная патология. – 2004. – № 1-2. – С. 85-89.
4. Козлов, В.Е. Аллергены для диагностики туберкулеза: совершенствование производства и стандартизация: автореф. дис. ... д-ра. вет. наук / В.Е. Козлов. – М., 2007. – 43 с.
5. Лысенко, А.П. Антигенный состав ППД туберкулина для млекопитающих / А.П. Лысенко // Ветеринария. – 1989. – №5. – С. 30–32.
6. Лысенко, А.П. Антигены *Mycobacterium bovis* и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота: автореф. дис. ... д-ра. вет. наук / А.П. Лысенко. – Мн., – 1994. – 35 с.
7. Получение высокоактивного и специфического аллергена для массовой диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота с помощью ультрафильтрации / А.П. Лысенко [и др.] // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2002. – № 1. – С. 4 – 8.
8. Активность и специфичность туберкулина очищенного в сравнении с PPD bovine и ППД туберкулином для млекопитающих / А.П. Лысенко [и др.] // Эпизоотология Иммунология Фармакология Санитария. – 2006. – № 2. – С. 4-10.
9. Сырым, Н.С. Аллерген из Л-форм *M. bovis* для диагностики латентной инфекции / Н.С. Сырым, Б.Ф. Керимжанова // Труды КазНИВИ. – 2000. – С. 123-127.
10. Шаров, А.Н. Аллергическая диагностика туберкулеза у животных: повышение ее эффективности: автореф. дис. ... д-ра. вет. наук / А.Н. Шаров. – М., 1989. – 29 с.
11. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th edition. – 2004.
12. Harboe, M. Antigens of old tuberculin and autoclaved *M.bovis* BCG / M. Harboe // Amer. Rev. Resp. Dis. – 1984. – Vol. 124, № 1. – P. 124-127.
13. Assays of different tuberculin products performed in guinea-pigs / J. Maxild [et. al.] // J. of Biological Standardization. – 1976. – № 4. – P. 171-187