

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

Лемиш А.П., кандидат ветеринарных наук, *

Архипов И.Н. *

Высоцкий А.Э., кандидат ветеринарных наук, доцент *

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

Салах У.М.**

Сас А.С.**

* РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», г. Минск

** УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины»,

г. Витебск

АКТИВНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ТУБЕРКУЛИНОВ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ЗАРАЖЕННОГО И СПОНТАННО БОЛЬНОГО ТУБЕРКУЛЕЗОМ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

На крупном рогатом скоте спонтанно и экспериментально инфицированном микобактериями туберкулеза и нетуберкулезными микобактериями изучена активность и специфичность контрольной серии туберкулина очищенного (ТО) для млекопитающих УП «Витебская биофабрика» в сравнении с ППД туберкулином AN 5 (Biovet Pulawy, Польша) и ППД туберкулином для млекопитающих ФГУП «Курская биофабрика»

Активность диагностической дозы ТО в сравнении с аналогами составила 9679-9863 СТУ/0,2 мл (48399-49319 СТУ/мл) или - 4193-4273 IU/0,2 ml (20969-21365 IU/ml) в единицах 1st International standard PPD *Mycobacterium bovis*, что лишь на 1,3-3,2% отличалось от предполагаемой активности 50000±10000 СТУ/мл.

Учитывая относительно благоприятную эпизоотическую ситуацию по туберкулезу крупного рогатого скота в Республике Беларусь, доза ТО может быть уменьшена в 2 раза (т.е. до 5000 МЕ в единицах старого стандарта -СТУ).

Перекрестная активность ТО УП «Витебская биофабрика» у крупного рогатого скота, зараженного нетуберкулезными микобактериями была на 58,5% ниже, чем у ППД туберкулина Biovet Pulawy.

Чувствительность и специфичность туберкулинов имеет существенное значение при массовой диагностике туберкулеза для гарантии устойчивого благополучия стад и минимизации убоя коров, инфицированных нетуберкулезными микобактериями (НТМБ). Недовыявление даже нескольких животных, инфицированных микобактериями туберкулеза (МБТ) может привести к вспышке болезни в стаде [2,3,4]. Вместе с тем, завышенная активность или низкая видовая специфичность диагностикума может повышать уровень ложноположительных реакций у коров, инфицированных НТМБ [1,6].

В 2003 г. на УП «Витебская биофабрика» начато производство туберкулина очищенного для млекопитающих (ТО). Необходимым этапом внедрения препарата является сравнение его диагностической ценности с зарубежными аналогами. По требованиям Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2004) [7] окончательную оценку препаратов туберкулинов необходимо проводить на крупном рогатом скоте спонтанно или экспериментально инфицированном МБТ. Учитывая, что ранее в республике широко применялся ППД туберкулин для млекопитающих ФГУП «Курская биофабрика» целью исследований было сопоставление ТО контрольной серии 37 УП «Витебская биофабрика» с этим препаратом, а также с ППД туберкулином из штамма AN 5 (Biovet Pulawy, Польша), стандартизированной

On cattle spontaneously and experimentally infected *M.bovis* tuberculosis and atypical mycobacteria activity and specificity of tuberculin purified (TP) for mammal a control lot «Vitebsk biofactory» in comparison with PPD AN 5 (Biovet Pulawy, Poland) and PPD «Kursk biofactory» is studied

Activity of a diagnostic dose TP in comparison with analogues has made 9679-9863 CTU/0,2 ml (48399-49319 CTU/ml) or - 4193-4273 IU/0,2 ml (20969-21365 IU/ml) in units 1st International standard PPD *Mycobacterium bovis*, that only on 1,3-3,2 % differed from prospective activity 50000±10000 CTU/ml.

Considering rather favorable epizootic a situation on a tuberculosis of cattle in Belarus, a dose TP can be reduced in 2 times (i.e. to 5000 ME in terms of the old standard-CTU).

Cross activity TP «Vitebsk biofactory» at the cattle infected atypical mycobacteria was on 58,5 % more low, than at PPD tuberculin AN5.

ванным по международному эталону 1st International standard Purified protein derivative (PPD) *Mycobacterium bovis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Активность и видовую специфичность ТО серии 37 в сравнении с ППД туберкулином из штамма AN 5 Biovet Pulawy изучали на крупном рогатом скоте старше 6 месяцев, зараженном живым штаммом *M. bovis* БЦЖ (3 гол.) и смесью *M. avium* 1603, *M. terrae* 17522, *M. fortuitum* 342 (3 гол.).

Исследования в условиях производства проведены комиссионно на 20 коровах неблагополучного по туберкулезу стада, которые за 60 суток до теста, реагировали на туберкулин и 39 коровах, находившимся с ними в тесном контакте.

В соответствии с OIE Manual и инструкцией National Institute for Biological Standards and Control UK (NIBSC) экспериментально инфицированным и 20 коровам, больным туберкулезом, с левой стороны шеи, вводили (0,2 мл) стандартного раствора ТО серии 37 (с содержанием белка-0,53 мг/мл) и этот же препарат в разведении 1:5. С правой стороны шеи вводили стандартный раствор ППД туберкулина Biovet Pulawy P-481/98 AN 5 (0,5 мг/мл), активностью 37500 СТУ/мл (16250 IU/мл стандарта 1986 г.) в дозах 7500 СТУ /0,2 мл (3250 IU/0,2 мл) и 1500 СТУ/0,2 мл (1:5, 650 IU/0,2 мл).

Находившимся в контакте с больными 39 коровам, внутривожно вводили по 0,2 мл ТО УП «Витебская биофабрика» производственной серии 31 (отобрана произвольно комиссией) и по 0,2 мл стандартного раствора ППД туберкулина для млекопитающих серии 11 Курской биофабрики.

Туберкулины вводили безыгольными инъекторами. Расстояние между точками инъекции составляло 15-20 см. Реакции учитывали через 72 ч. путем измерения утолщений кожных складок.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В таблице 1 приведены результаты сравнения активности и видовой специфичности ТО серии 37 и ППД туберкулина Biovet Pulawy у экспериментально инфицированных животных. Среднее утолщение на диагностическую дозу ТО составило 4,0 мм, на ППД туберкулин Biovet Pulawy – 3,83 мм. Из 6 случаев интенсивность реакции на отечественный препарат была в 1 выше, а в 5 совпадала с аналогом.

При сравнении интенсивности реакций в зависимости от логарифма дозы в единицах активности СТУ (рис.1) и логарифма концентрации белка (рис.2) линии активности практически совпадали, что указывает, на примерно, равную активность препаратов у животных, зараженных *M. bovis*.

У животных, инфицированных НТМБ, оба туберкулина выявляли одинаковое количество животных. Однако интенсивность реакций на ППД туберкулин Biovet Pulawy была заметно выше (табл.1). На рисунке 3 представлена зависимость интенсивности аллергических реакций у крупного рогатого скота, инфицированного НТМБ от дозы белка в туберкулинах. Как видно расстояние между линиями активности, в среднем, составило $-0,24 \lg$, $\text{antilog}-0,24=0,58$. Это указывает на то, что активность диагностической дозы ТО (10000СТУ) у животных, инфицированных НТМБ, существенно ниже и соответствует дозе ППД туберкулина Biovet Pulawy - 4350 СТУ.

При сопоставлении ТО серии 37 УП «Витебская биофабрика» и ППД туберкулина AN 5 Biovet Pulawy в неблагополучном стаде (табл.2) на ППД туберкулин AN 5 Biovet Pulawy реагировало - 13 коров, на ТО серии 37 УП «Витебская биофабрика» -15 коров, а на разведенные (1:5) препараты, соответственно, 3 и 8 коров.

При сравнении интенсивности реакций на цельные и разведенные препараты в 19 случаях реакции совпадали по интенсивности, в 15 случаях были интенсивнее (+) на ТО серии 37, в 5 значимых случаях - более интенсивными на ППД туберкулин AN 5 Biovet Pulawy

(-). Таким образом, при оценке по критерию знаков ТО серии 37 УП «Витебская биофабрика» оказался достоверно более активным.

Таблица 1 - Утолщения кожных складок (в мм) и оценка интенсивности реакций у крупного рогатого скота экспериментально инфицированного микобактериями разных видов на введение ТО контрольной серии 37 и ППД туберкулина AN 5 Biovet Pulawy

№ животного	Контрольная серия ТО серии 37		ППД туберкулин AN 5	
	Цельный 0,106 мг/0,2мл	1:5 0,0202 мг/мл	3250 IU 0,1 мг/0,2 мл	650 IU 0,02 мг/0,2 мл
Инфицированы <i>M.bovis</i> BCG				
12	2 +	1 =	0,5	1
25	3 =	2 =	3	2
1	7 -	3 =	8	3
M=	4,0	2,0	3,83	2,0
Сумма	18		17,5	
Инфицированы <i>M.avium</i> 1603, <i>M.terrae</i> 17522, <i>M.fortuitum</i> 342				
50	7 -	4 -	10	7
54	4 -	1 -	5	2
44	8 +	3 -	6	4
M=	6,3	2,67	7,0	4,3
Сумма	27		34	

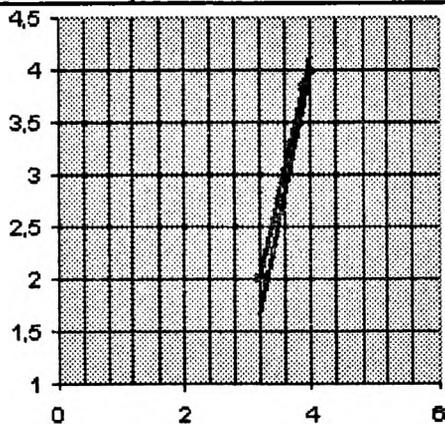


Рис. 1

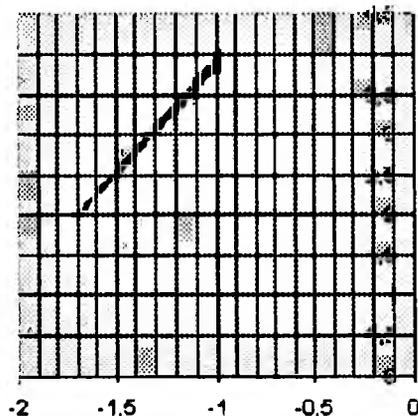


Рис. 2

Рис. 1,2 - Зависимость интенсивности кожных реакций на ТО серии 37 и ППД туберкулина Biovet Pulawy у крупного рогатого скота, инфицированного *M.bovis* от логарифма дозы в единицах активности СТУ (рис. 1) и логарифма концентрации белка в мг/мл (рис. 2)

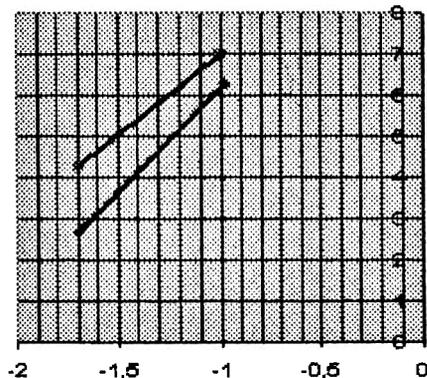


Рис. 3 - Зависимость интенсивности аллергических реакций у крупного рогатого скота, инфицированного нетуберкулезными микобактериями от логарифма дозы белка в туберкулинах. Верхняя линия ППД туберкулин AN 5 Biovet Pulawy, нижняя - ТО серии 37

Сумма утолщений кожной складки на ППД туберкулин AN 5 Biovet Pulawy составила 90,5 мм, на ТО серии 37 УП «Витебская биофабрика» -119. Исходя из этих данных, ориентировочная активность контрольной серии 37, рассчитанная методом прямой пропорции составила:

- $119:90,5 \times 7500 \text{ STU}/0,2 \text{ мл} = 9863 \text{ STU}/0,2 \text{ мл}$ (49319 STU/мл) или в единицах 1st International standard Purified protein derivative (PPD) Mycobacterium bovis - $4273 \text{ IU}/0,2 \text{ ml}$ (21365 IU/ml).

Определенная, таким образом, активность контрольной серии 37, составила 98,7% от заявленной (50000 STU/мл).

На рис. 4 показана зависимость интенсивности реакций на ТО серии 37 и ППД туберкулин AN 5 Biovet Pulawy от логарифма дозы. Как видно, расстояние между линиями активности по оси абсцисс составляет $0,11 \lg$, $\text{antilog } 0,11=1,29$. Следовательно, активность дозы ТО серии 37 составляет:

$7500 \text{ STU}/0,2 \text{ мл} \times 1,29=9679 \text{ STU}/0,2 \text{ мл}$ (48399 STU/мл) или $4193 \text{ IU}/0,2 \text{ ml}$ (20969 IU/ml) в единицах 1st International standard Purified protein derivative (PPD) Mycobacterium bovis.

Таким образом, определенная активность контрольной серии 37 по логарифмической зависимости «доза – эффект» составила - 96,8% от заявленной (50000 STU/мл), что лишь на 1,9% отличается от показателя, рассчитанного методом прямой пропорции и соответствует требованиям ТУ РБ 600049853.032-2003 и ГОСТ 16739-88.

При сравнении ТО серии 31 и ППД туберкулина Курской биофабрики, серии 11 на 39 коровах, находившимся в контакте с больными животными (табл.3), установлено, что на оба туберкулина реагировало по 9 голов, интенсивность реакций совпала в 28 случаях, в 6 случаях (+) была более выраженной на ТО серии 31 УП «Витебская биофабрика» и в 5 случаях более выраженной на ППД туберкулин Курской биофабрики. Согласно ТУ РБ 600049853.032-2003 и ГОСТ 16739-88, полученные результаты свидетельствовали о равной активности туберкулинов.

Таблица 2 - Сравнительная активность туберкулинов на 20 головах коров, больных туберкулезом

Инв. номера коров	Утолщение кожной складки до и после инъекции туберкулинов, результат в мм, оценка интенсивности реакций			
	ППД туберкулин AN 5 Biovet Pulawy		ТО серии 37 УП «Витебская биофабрика»	
	стандартный раствор	1:5	стандартный раствор	1:5
1	2	3	4	5
4545	5-7=2	5-7=2	5-9=4 (+)	5-7.5=2.5 (+)
7076	5.5-11.5=6	5.5-9=3,5	5.5-17=11.5 (+)	5.5-13=7.5 (+)
8713	7-11=4	7-7=0	7-10=3 (-)	7-7=0 (=)
600	7-10=3	7-8=1	6-9=3 (=)	6-6=0 (-)
3805	7-7=0	7-7=0	7-7=0 (=)	7-7=0 (=)
4042	7-13=6	7-11=4	7-10=3 (-)	5-6=1 (-)
3831-3863	7-15=8	7-11=4	7-12=5 (-)	7-10=3 (-)
4578	6-9=3	6-6=0	6-9=3(=)	6-6=0(=)
3868	7-10=3	7-7=0	7-14=7(+)	7-12=5(+)
3870	8-11=4	8-9=1	8-15=7(+)	8-11=3(+)
5712-3859	5-7=2	5-5=0	5-7=2(=)	5-5=0(=)
3839	6-9=3	6-6=0	6-9=3(=)	6-6=0(=)
3885	7-12=5	7-9=1	7-16=9(+)	7-12=5(+)
3896	6-7=1	6-6=0	6-7=1(=)	6-6=0(=)
3841	5-5=0	5-5=0	5-5=0(=)	5-5=0(=)
4558	8-13=5	8-10=2	8-13=5(=)	8-11=3(+)
4076	5-10=5	5-7=1	5-11=6(+)	5-9=4(+)

1	2	3	4	5
8714	6-11=5	6-9=3	7-13=6 (+)	7-10=3 (=)
4563	6-6=0	6-6=0	6-6=0 (=)	6-6=0 (=)
4523	8-10=2	8-8=0	8-12=4 (+)	8-8=0 (=)
Реагировало	13	3	15	8
Сумма утолщений в мм	67	22,5	82	37
	90,5		119	
Среднее утолщение в мм	3.35	1.13	4.1	1.85

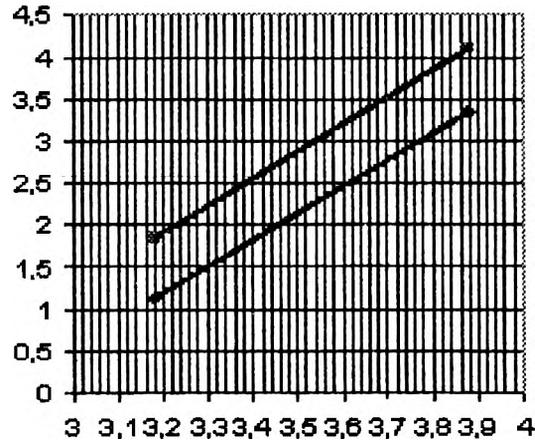


Рис.4 - Зависимость интенсивности аллергических реакций на ТО серии 37 (верхняя линия) и ППД туберкулин AN 5 Biovet Pulawy от логарифма дозы. По шкале абсцисс логарифм дозы, по шкале ординат среднеарифметические утолщения кожной складки

Таблица 3 - Результаты сравнения туберкулинов на 39 коровах неблагополучного по туберкулезу стада

Инв. №	Утолщение кожной складки до и после инъекции туберкулинов, результат в мм, оценка интенсивности реакций		Оценка интенсивности реакций
	ППД туберкулин Курской биофабрики, с. 11	ТО серии 31 УП «Витебская биофабрика»	
1	2	3	4
3881	5-5=0	5-5=0	=
Б №	5-8=3	5.5-8.5=3	=
4509-8742	5-5=0	5-5=0	=
8790	5-5=0	5-5=0	=
8782	6-9=3	5-6=1	-
4514	8-15=7	8-15=7	=
4538	5-5=0	5-5=0	=
4547	5-5=0	5-5=0	=
4542	7-10=3	7-13=6	+
8755	5-5=0	5-5=0	-
3895	5-5=0	5-5=0	-
4594	5-8=3	5-8=3	=
3822-3042	5-5=0	5-5=0	=
4599-4575	5-5=0	5-5=0	=
1200	7-9=2	7-9=2	=
3857	5-5=0	5-5=0	=
4512	5-5=0	5-5=0	=
0708	5-5=0	5-5=0	=
4531	6-8=2	6-8=2	=

1	2	3	4
6059	5-5=0	5-5=0	=
3867	7-7=0	7-11=4	+
3833	5-5=0	5-5=0	=
3855	5-5=0	5-5=0	=
6229	5-5=0	5-5=0	=
4589	5-5=0	5-5=0	=
3802-6011	6-8=2	6-7=1	-
1200	5-5=0	5-5=0	=
6730	7-7=0	7-13=6	+
6089	7-13=6	7-7=0	-
8740	5-5=0	5-5=0	=
4597	8-11=3	7-12=5	+
4537	5-5=0	5-5=0	=
3851	5-5=0	5-5=0	=
1338	5-7=2	5-7=2	=
2555	5-5=0	5-5=0	=
430	6-11=5	6-13=6	+
1204	6-13=7	6-16=10	+
0709	5-5=0	5-5=0	=
8738	5-5=0	5-5=0	=
Реагировало	9 голов	9 голов	

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ППД туберкулин AN 5 Biovet используют для аллергической диагностики в Польше в диагностической дозе 7500 STU [8], которая на 25% ниже, чем в нашей республике. Поэтому, в опыте на коровах, больных туберкулезом, на ТО серии 37 УП «Витебская биофабрика» в стандартном разведении реагировало на 2 коровы (15,4%) больше. Разница при использовании туберкулинов в разведении 1:5 была более существенной, соответственно, 8 и 3 выявленных особи. В целом, при оценке результатов по критерию знаков ТО УП «Витебская биофабрика» оказался достоверно более активным. Учитывая, что ППД туберкулин AN 5 Biovet Pulawy стандартизирован относительно 1st International standard PPD M. bovis, было определено, что активность диагностической дозы ТО контрольной серии 37 составила 9679-9863 STU/0,2 мл (48399-49319 STU/мл) или в единицах 1st International standard PPD M. bovis – 4193-4273 IU/0,2 ml (20969-21365 IU/ml). Таким образом, активность ТО контрольной серии 37 лишь на 1,3-3,2% отличалась от регламентированной ТУ РБ 600049853.032-2003 и ГОСТ 16739-88 (50000±10000 STU/мл).

По рекомендации OIE Manual (2004) [7] в благополучных странах доза туберкулина для крупного рогатого скота должна быть в пределах 2000 IU (+/-25%), а при проведении мероприятий по оздоровлению - 5000 IU (+/-25%), в единицах активности 1st International standard PPD 1986 г.. Согласно полученных результатов доза ТО составила 4193-4273 IU/0,2ml, что коррелирует с дозой 4391 IU - 5158 IU/0,2 ml, определенной в опыте на морских свинках [неопубликованные данные].

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 -STU), что может сократить число ложноположительных реакций (на 14-32%) [1] без ущерба выявления животных, инфицированных возбудителем туберкулеза.

Особый интерес представляло изучение перекрестной активности туберкулинов на крупном рогатом скоте, инфицированном нетуберкулезными микобактериями. Несмотря на то, что оба туберкулина выявляли одинаковое количество животных, перекрестная актив-

ность ТО, рассчитанная по методу «логарифм дозы-эффект», показало, что она на существенно ниже, чем у ППД туберкулина Biovet Pulawy. Следовательно, технология получения ТО, основанная на удалении высокомолекулярной фракции (более 300 кДа) ультрафильтрацией [5] обеспечивает получение более специфичного диагностикума, чем традиционный метод осаждения туберкулопротеинов трихлоруксусной кислотой и сульфатом аммония.

Оценка активности ТО относительно ППД туберкулина Biovet Pulawy полностью коррелировало с результатами сравнения активности производственной серии ТО с ППД туберкулином Курской биофабрики, что подтверждает возможность замены этого диагностикума отечественным препаратом.

ВЫВОДЫ

1. Активность диагностической дозы туберкулина очищенного (ТО) контрольной серии 37 составила 9679-9863 СТУ/0,2 мл (48399-49319 СТУ/мл) или – 4193-4273 IU/0,2 ml (20969-21365 IU/ml) в единицах 1st International standard PPD *Mycobacterium bovis*, что лишь на 1,3-3,2% отличалась от регламентированной ТУ РБ 600049853.032-2003 и ГОСТ 16739-88 (50000±10000 СТУ/мл).
2. Учитывая относительно благоприятную эпизоотическую ситуацию по туберкулезу крупного рогатого скота в республике, доза ТО может быть уменьшена в 2 раза (т.е. до 5000 МЕ в единицах старого стандарта -СТУ).
3. Перекрестная активность туберкулина очищенного УП «Витебская биофабрика» у крупного рогатого скота, зараженного нетуберкулезными микобактериями на 58,5% ниже, чем у ППД туберкулина Biovet Pulawy.
4. Активность производственной серии 31 туберкулина очищенного (ТО) УП «Витебская биофабрика» достоверно не отличалась от активности ППД туберкулина для млекопитающих Курской биофабрики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Донченко А.С., Смолянинов Ю.И., Сысоев В.А. Мероприятия по дифференциации парааллергических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота и их экономическая эффективность // Сб. науч. тр. / ВАСХНИЛ. Сиб. отделение ИЭВСиДВ. - Новосибирск, 1985. - С. 34-38.
2. Козлов В.Е., Букина Н.К., Найманов А.Х. Оценка активности и специфичности коммерческих серий туберкулина (ППД) для млекопитающих отечественного и зарубежного производства // Ветеринарная патология - № 1-2.-2004.- с. 82-85.
3. Козлов В.Е., Безгин В.М., Шумилов К.В., с соавт. Оценка активности национального стандарта туберкулина (ППД) для млекопитающих относительно 1-го международного стандарта туберкулина (PPD) bovine // Ветеринарная патология - 2004.- № 1-2. - с. 85-89.
4. Козлов В.Е. Аллергены для диагностики туберкулеза: совершенствование производства и стандартизация. - Автореф. дис. докт. вет. наук. - М. – 2007.-43 с.
5. Лысенко А.П., Безгин В.М., Козлов Д.Е., Притыченко А.Н. Получение высокоактивного и специфического аллергена для массовой диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота с помощью ультрафильтрации // Ветеринарная медицина Беларуси. - 2002. - № 1. – С. 4 – 8.
6. Шаров А.Н. Аллергическая диагностика туберкулеза у животных: повышение ее эффективности // Автореф. дис. докт. вет. наук. - М.-1989.-29 с.
7. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th edition, 2004.
8. Rozpozazenie ministra rolnictwa I rozwoju wsi w sprawie zwalczania gruźlicy bydła 23 listopada 2004 г.