

УДК 619:616.98:579.873.21-07

Притыченко А.Н., к.вет.н., доцент ©*УО «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь***БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТЬ ТУБЕРКУЛИНА ОЧИЩЕННОГО
ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ППД ТУБЕРКУЛИНА В
СИМУЛЬТАННОЙ ПРОБЕ**

Туберкулин очищенный для молокопитающих производства ОАО «БелВитунифарм» и ППД туберкулин производства Курской биофабрики в симультанной пробе биоэквивалентны. Для повышения чувствительности диагностики туберкулин очищенный целесообразно использовать в дозе 5000 МЕ (2000 IU/ml) в хозяйствах Республики Беларусь (исключая неблагополучные стада).

Ключевые слова: ППД, диагностика туберкулеза, доза туберкулина.

Введение. В настоящее время туберкулёз остаётся одной из глобальных проблем инфекционной патологии человека и животных во всём мире. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВООЗ), третья часть населения земного шара инфицирована возбудителем туберкулёза [7, 8].

В Республике Беларусь эпизоотическая ситуация в Республике по туберкулёзу остаётся довольно сложной. Туберкулёз чаще встречается у крупного рогатого скота [4, 13]. Основным методом прижизненной диагностики туберкулёза крупного рогатого скота остаётся аллергическая проба с туберкулином [5, 12].

Туберкулины представляют собой сложные смеси водорастворимых антигенов микобактерий туберкулеза, выращенных на жидких питательных средах, инактивированных высокой температурой. Существует несколько разновидностей туберкулинов: альттуберкулины (АТК), НСМ (безальбумозные) и РРД (purified protein derivative, ППД) туберкулины, которые получают по разным технологиям [3, 4, 5, 17].

Основные требования к производству туберкулинов определены ВООЗ (всемирная организация здравоохранения) и МЭБ (международное эпизоотическое бюро). Они касаются терминологии, штаммов-продуцентов, безопасности производства и конечного продукта, а также обеспечения его соответствия международному эталону [11, 16].

Туберкулины, изготовленные по технологии АТК, но с применением безбелковой среды, получили название НСМ (heat culture syntetic medium – гретый культуральный фильтрат синтетической питательной среды) [19]. НСМ содержал продукты аутолиза МБТ и небелковые компоненты питательной среды, что позволило стандартизировать его по концентрации туберкулопротеинов и снизило реактогенность [18, 19].

Туберкулины НСМ, в частности «Introvac poly» фирмы Miffa Merieux, использовались в программах ликвидации туберкулеза разных стран. Directive 80/219 ЕЕС и OIE Manual of Diagnostic Tests [15] разрешает применение НСМ наравне с ППД.

В 1934 г. F. Seibert путём пятикратного пересаживания туберкулопротеинов из автоклавированного культурального фильтрата полунасыщенным раствором СА получила препараты, названные purified protein derivative (PPD). На основе этого метода была разработана соответствующая технология и создан американский туберкулин и стандарт PPD-S [8]. В 1946 г. Green предложил для осаждения туберкулопротеинов - трихлоруксусную кислоту (ТХУ) [14].

Признано, что технологии получения ППД с многократным пересаживанием туберкулопротеинов с обработкой органическими растворителями, повышают выход белка. Однако, на каждой стадии происходит значительная потеря активных компонентов, что с учетом технологических затрат существенно увеличивает стоимость конечного продукта [5]. Это не играет роли, если туберкулины предназначены для медицинских целей, где используются дозы 2-100 МЕ, и нет необходимости наработки значительной массы туберкулопротеинов. В ветеринарной практике применяют гораздо большие дозы (5000-10000 МЕ), поэтому потери активных веществ при многократном пересаживании, существенно повышают стоимость препарата. Кроме того, целесообразность применения высокоочищенных туберкулинов проблематична, так как убедительно не доказано, что по диагностическим свойствам они лучше АТК или НСМ [5, 9, 10].

Разработка технологий получения ППД туберкулинов рассматривалось, как мера повышения качества диагностикума. Но по мере использования ППД на практике, выяснилось, что заметных преимуществ перед менее очищенными препаратами он не имеет [10]. Сравнение ППД и НСМ туберкулинов в полевых опытах на крупном рогатом скоте показало, что чувствительность НСМ была выше (87,9%), чем ППД (81,9%). Специфичность ППД составила - 96,3%, а НСМ - 90,8% [9], но при выравнивании активности, небольшая разница в специфичности исчезала. Примерно такая же закономерность была установлена при сравнении высокоочищенного туберкулина I. P. 48 (Институт Пастера, Франция) и альттуберкулина Коха [цит. по 2].

Выпуск препарата типа НСМ налажен на ОАО «БелВитунифарм». Симультанная проба является важным элементом системы профилактических мероприятий в дифференциальной аллергической диагностике туберкулёза крупного рогатого скота. Известно, что в симультанной пробе с ППД туберкулином для птиц (10000 МЕ) и КАМ (1370 ЕД) применяли ППД туберкулин для млекопитающих Курской биофабрики в дозе 10000 МЕ. Было убедительно доказано, что такие дозы аллергенов биоэквивалентны в симультанной пробе, то есть порядка 95% животных, инфицированных МБТ должны более интенсивно реагировать на ППД для млекопитающих [1]. Следовательно, ППД туберкулин для млекопитающих Курской биофабрики,

можно использовать в качестве контроля при изучении биоэквивалентности ТО в симультанной пробе.

Таким образом, нами поставлена цель изучить биоэквивалентность туберкулина очищенного для млекопитающих производства ОАО «БелВитунифарм» и ППД туберкулина производства Курской биофабрики в симультанной пробе для млекопитающих в сравнении с эталонными образцами препарата и оценить возможность применения туберкулина очищенного для млекопитающих в дозе 5000 МЕ (2000 IU).

Методы исследования. Работа выполнена на кафедре микробиологии и вирусологии УО ВГАВМ, ОАО «БелВитунифарм», в отделе зоонозов и разработки диагностических препаратов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», сельскохозяйственных предприятиях Беларуси.

В опыте на крупном рогатом скоте, экспериментально инфицированном возбудителем туберкулеза и смесью НТМБ (*M. avium* 1603, *M. terrae* 17522, *M. fortuitum* 342) сопоставили биоэквивалентность ТО и КАМ. Контролем служил ППД туберкулин Курской биофабрики.

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1

Сравнение ТО и ППД туберкулина в симультанной пробе на экспериментально инфицированном крупном рогатом скоте

Номер животного	Утолщение кожной складки в мм			Оценка симультанной пробы ППД/ТО
	ППД туберкулин, с. 11	ТО с. 37	КАМ с.9	
Животные, инфицированные <i>M. bovis</i> BCG				
9733	13	9	6	+/+
7287	4	4	1,5	+/+
Животные, инфицированные, <i>M. avium</i> 1603, <i>M. terrae</i> 17522, <i>M. fortuitum</i> 342				
9729	9	7	9	=/-
5903	2	7	6	-/+
9747	4	6	9	-/-

Как видно из таблицы 1, все животные, инфицированные *M. bovis*, были правильно определены с помощью ТО и КАМ. Из числа животных, инфицированных НТМБ, оба аллерегена правильно определили 2 из 3. Это позволило предположить, что сравниваемые препараты были биоэквивалентны в симультанной пробе. Для подтверждения этого были проведены исследования на 586 коровах 3 стад, благополучных по туберкулезу. Животным одновременно вводили ППД, ТО и КАМ. У 568 голов реакции отсутствовали на все аллерегены. Из 18 реагировавших животных реакции на ППД туберкулин и КАМ коррелировали в 18 случаях, на ТО в - 17.

В комисионном опыте на 371 корове МТФ «Ж» так же одновременно сравнили ППД, ТО и КАМ (таблица 2).

Таблица 2

Биоэквивалентность ТО и ППД в симультанной пробе на коровах МТФ «Ж»

Инв. № коровы	ППД Курской биофабрики серия 11	ТО серия 50	КАМ	Оценка реакции
	Утолщение кожной складки в мм			
0887	7	6	11	-
7092	3,5	3	4	-
9314	2	2	3	-
0803	4,5	2	8	-
0841	4	4	5	-
7032	2	2	4	-
21956	3	2	6	-
21962	3	4	2	+
21904	2	2	4	-
21999	2	2	4	-
0126	3	3	9	-
0106	2	2	5	-
7209	1	2	10	-
0330	5	6	4	+
0141	6	6	7	-
0302	5	3	9	-
5660	5	5	8	-
0475	3	4	5	-
0386	5	5	0	+
2446	3	4	5	-
0319	4	4	2	+
0533	5	2	8	-
0328	4	4	6	-

Как видно из таблицы 2 на аллергены реагировало 23 коровы. Во всех 23 случаях (100%) ТО дал такую же оценку реакции в сравнении с КАМ, как и ППД Курской биофабрики. Причем, если сравнить интенсивность реакций, то в 8 случаях (34,8%) видовая специфичность ТО была выше, а ППД - только в 2 (8,7%). В 2 (8,7%) случаях при более интенсивной реакции на КАМ, реакция на ТО отсутствовала. Это указывает на то, что при инфицировании коров НТМБ ТО может выявлять на 8,7% меньше особей с ложноположительными реакциями.

Таким образом, с учетом результатов, представленных в таблицах 1 и 2 можно сделать вывод о возможности использования ТО в симультанной пробе.

Нами изучена возможность применения туберкулина очищенного в дозе 5000 МЕ (2000 IU)

В настоящее время для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота в благополучных регионах рекомендуется доза 2000 IU. Для зон, в которых проводятся кампании по ликвидации болезни, рекомендована доза 4000 IU. Наши исследования показали, что диагностическая доза стандартного раствора ТО 10000 МЕ/0,2 мл, соответствует по активности 4000 IU \pm 25%. Следовательно, в зонах с благоприятной эпизоотической ситуацией можно применять дозу туберкулина, уменьшенную в 2 раза, то есть 5000 МЕ (2000 IU).

Биоэквивалентность доз 5000 МЕ ТО и ППД туберкулина Курской биофабрики определяли на молодняке крупного рогатого скота, экспериментально инфицированного *M. bovis* (таблица 3).

Таблица 3

Сравнение биоэквивалентности дозы 5000 МЕ ТО и ППД туберкулина Курской биофабрики на молодняке крупного рогатого скота, экспериментально инфицированного *M. bovis*

№ животного	Утолщения кожных складок в мм		Оценка интенсивности реакций
	ППД сер. 11, 5000 МЕ	ТО сер. 15, 5000 МЕ	
1050	6	4	-
6058	8	8	=
6024	3	2	-
2712	4	6	+
2780	0	3	+

Различия недостоверны

Как видно из таблицы 3 из 5 инфицированных животных оба аллерегена выявили по 4 животных, а интенсивность реакций достоверно не отличалась.

Для сравнения диагностической эффективности доз ТО 10000 и 5000 МЕ провели опыт на молодняке крупного рогатого скота, инфицированном *M. bovis* (таблица 4). Как видно из таблицы, зараженные животные реагировали на обе дозы, интенсивность аллергических реакций достоверно не отличалась ($P \leq 5\%$).

Таблица 4

Утолщения кожной складки (в мм) при введении 10000 и 5000 МЕ туберкулина очищенного крупному рогатому скоту, инфицированному *M. bovis*

Вид микобактерий	Номера животных	ТО серии 20	
		10000 МЕ	5000 МЕ
<i>M. bovis</i>	1	4	5
	2	21	16
	3	8	9
	4	6	5
M \pm m		6,5 \pm 1, 4	5,5 \pm 1, 1

Сравнение ТО в дозе 5000 МЕ с ППД туберкулином Курской биофабрики в дозе 10000 МЕ проведено в полевых условиях на 94 коровах ф. «Б», на которой отмечались рецидивы болезни (таблица 5).

Таблица 5

Результаты испытания ТО серии 18 в дозе 5000 МЕ в сравнении с ППД туберкулином Курской биофабрики в дозе 10000 МЕ на ф. «Б»

Номер животного	Утолщения кожных складок в мм через 72 ч после введения	
	ППД туберкулин 10000 МЕ	ТО серии 18 5000 МЕ
8222	4	6
8286	4	8
8300	2	5
8271	4	4
8243	4	4
8264	4	6
8209	2	5
8217	3	4
8285	2	10
8282	0	3
Реагировало положительно	6	10

Как видно из таблицы 5 на ППД туберкулин в дозе 10000 МЕ реагировало 6 голов, в то время как ТО в дозе 5000 МЕ, выявил 10 голов (т.е. на 40% больше). Таким образом, ТО в дозе 5000 МЕ (2000 IU) выявлял даже больше инфицированных животных, чем ППД туберкулин в дозе 10000 МЕ (4000 IU).

Помимо высокой специфической активности ТО в дозе 5000 МЕ имел более высокую видовую специфичность. В таблице 6 приведены результаты исследования 294 коров длительно благополучного стада СПК «Н», где часть животных была предварительно проверена симультанной пробой.

Установлено, что на ППД туберкулин в дозе 10000 МЕ реагировало 16 коров (5,4%). На ТО в дозе 5000 МЕ реагировало только 2 коровы (0,68% или в 8 раз меньше). Предварительные результаты симультанной пробы (более интенсивные реакции на КАМ) показали, что такие реакции не были связаны с инфицированием МБТ.

Таблиця 6

Результаты испытания ТО серии 18 в дозе 5000 МЕ в сравнении с ППД туберкулином Курской биофабрики в дозе 10000 МЕ в длительно благополучном по туберкулезу стаде СПК «Н»

Инвентарный номер коровы	Утолщения кожных складок в мм			
	ППД туберкулин в дозе 10000 МЕ	ТО в дозе 5000 МЕ (2000 IU)	Результат симультанной пробы, проведенной 60 дней ранее	
			ППД туберкулин	КАМ
2691	4	0		
2053	4	3		
0482	3	0		
3876	3	0		
0586	3	0		
2126	7	2		
2694	3	0		
3864	7	0	5	11
3549	2	0		
146	2	0		
2231	3	0		
2700	6	0		
0564	4	0	5	7
3500	3	0		
2159	5	0		
4354	3	3		
2395	5	0	3	5
174	4	0		

Следовательно, применение ТО в дозе 5000 МЕ не снижает эффективности выявления больных и инфицированных животных, но существенно уменьшает число неспецифических реакций на туберкулин, что связано с более высокой видовой специфичностью ТО. Это подтвердили и результаты сравнения ППД туберкулина и ТО в дозе 5000 МЕ на 102 коровах в длительно благополучном по туберкулезу стаде ф. «Ч» СПК «З» (таблица 7).

Установлено, что из 102 исследованных коров - 6 имели значимые увеличения кожной складки (на 2 мм и более). Из них на ППД туберкулин положительно реагировали 5, а на ТО - 3 коровы (на 40% меньше).

Таблиця 7

Результаты испытания ТО в сравнении с ППД туберкулином Курской биофабрики в длительно благополучном по туберкулезу стаде ф. «Ч»

Инвентарный номер, кличка коровы	Утолщения кожных складок в мм		Оценка интенсивности реакций
	ППД сер. 11, 5000 МЕ	ТО сер. 16, 5000 МЕ	
Мечта	3	2	-
3167	5	4	-
Румина	2	2	=
Фея	6	6	=
Лада	4	3	-
7929	4	2	-

Использование ТО в дозе 5000 МЕ показало положительный эффект при исследовании больших контингентов животных в длительно благополучных районах - снижение числа реагирующих коров в 3,7 раза с 0,22% до 0,06% (таблица 8).

Таблиця 8

Результаты применения ТО в дозе 5000 МЕ в длительно благополучных по туберкулезу хозяйствах Могилевской области

Район	ППД Курской биофабрики в дозе 10000 (3 месяца 2003 г.)			ТО в дозе 5000 (3 месяца 2004 г.)		
	Исследовано, голов	Выявлено	%	Исследовано, голов	Выявлено	%
Бобруйский	17185	50	0,29%	13670	12	0,09%
Кировский	9272	4	0,04%	4446	0	0
Кличевский	5933	4	0,07%	3260	0	0
Осиповичский	9529	49	0,51%	9473	5	0,05%
Глусский	6890	2	0,03%	4948	3	0,06%
Итого	48809	109	0,22%	35797	20	0,06%

В условиях эксперимента и в стадах с разной эпизоотической ситуацией доказано, что ТО, пригоден для симультанной пробы. Исходя из литературных данных, такая «пригодность» или «биоэквивалентность» связана с правильной стандартизацией активности туберкулина [13, 5, 12].

Важным моментом был выбор диагностической дозы ТО. В принципе, несмотря на определенную сложность эпизоотической ситуации по туберкулезу в республике [6], можно считать, что «кампания по ликвидации болезни» была успешно завершена к началу 21 века. В этой связи, по рекомендациям OIE Manual можно применять сокращенную дозу туберкулина, т.е. 5000 МЕ (2000 IU), хотя в научной литературе существуют противоречивые взгляды на эффективность этой меры [4, 5, 9]. На экспериментально зараженных животных и в полевых условиях было доказано, что доза ТО 5000 МЕ эффективно

выявляет животных, зараженных возбудителем туберкулеза, но в благополучных стадах при инфицировании НТМБ, число ложноположительных реакций снижается, в ряде случаев в 8 раз.

Заключение. В целом, проведенные испытания показали, что серии ТО, выпущенные в разные годы, практически не отличаются друг от друга и обеспечивают стандартность диагностики. Для повышения чувствительности диагностики туберкулин очищенный целесообразно использовать в дозе 5000 МЕ (2000 IU/ml) во всех хозяйствах республики (исключая неблагополучные стада), что позволит существенно снизить необоснованный убой крупного рогатого скота. Туберкулин очищенный можно использовать в симультанной пробе с КАМ или ППД туберкулином для птиц.

Литература

1. Активность и специфичность туберкулинов у экспериментально зараженного и спонтанно больного туберкулезом крупного рогатого скота / А.П. Лысенко [и др.] // Экология и животный мир. – 2008. – № 3. – С. 56–62.
2. Василев, В.Н. Микобактериозы и микозы легких / В.Н. Василев. – София : Медицина и физкультура, 1971. – С. 9–13, 30–37, 42–53, 181–202, 205–227, 231–271.
3. Вышелесский, С.Н. Частная эпизоотология / С.Н. Вышелесский. – М. : Сельхозиздат, 1948. – 432 с.
4. Донченко, Н.А. Усовершенствование средств и методов диагностики и профилактики туберкулеза крупного рогатого скота : автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 16.00.03, 16.00.04 / Н.А. Донченко ; ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН. – Новосибирск, 2008. – 36 с.
5. Козлов, В.Е. Стандартизация аллергенов для дифференциальной диагностики туберкулеза / В.Е. Козлов // Ветеринария. – 2007. – № 5. – С. 6–8.
6. Лысенко, А.П. Антигены *M. bovis* и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота : автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 16.00.03 / А.П. Лысенко ; БелНИИ экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского. – Минск, 1994. – 35 с.
7. Мельников, В. Социально-экономическое значение туберкулеза (обзор литературы) / В. Мельников, Ю. Смолянинов // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2009. – № 5. – С. 4–9.
8. Москаленко, В.Ф. Актуальні проблеми туберкульозу в Україні за останні 10 років. / В.Ф. Москаленко, Ю.І. Фещенко // Укр. пульмонологічний журн. – 2001. – № 3. – С. 5–7.
9. Овдиенко, Н.П. Сравнительная оценка активности ППД-туберкулинов для млекопитающих производства СССР, ЧССР и ГДР / Н.П. Овдиенко, А.Х. Найманов // Актуальные проблемы туберкулеза и бруцеллеза сельскохозяйственных животных : сб. науч. тр. / Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока. – Новосибирск, 1989. – С. 35–41.
10. Овдиенко, Н.П., Найманов, А.Х. Сравнительное изучение

диагностической ценности ППД и альттуберкулина для млекопитающих / Н.П. Овдиенко, А.Х. Найманов ; ВИЭВ. – М., 1983. – Т. 50. – С. 10–15.

11. Туберкулёз сельскохозяйственных животных / В.П. Шишков [и др.] – М. : Агропромиздат, 1991. – 225 с.

12. Шаров, А.Н. Аллергическая диагностика туберкулёза у животных : повышение её эффективности : автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 16.00.03 / А.Н. Шаров ; Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии. – М., 1989. – С. 9–10, 32–34.

13. Юсковец, М.К. Туберкулез сельскохозяйственных животных и птиц / М.К. Юсковец. – Минск : Ураджай, 1963. – 448 с.

14. Green, H.H. Description and preparation of Weybridge purified protein derivative tuberculins / H.H. Green // World Health Organization Monography Series. – 1953. – Vol. 19. – P. 45–54.

15. OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals // Fifth Edition. – 2004. – Vol. 1. – P. 723.

16. Palmer, D. N. Bovine tuberculosis in OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th ed. / D. N. Palmer // World Organisation for Animal Health, France [Electronic resource] – 2004. – Mode of access: [http : //www.oie.int/eng/normes/en_mmanual.htm](http://www.oie.int/eng/normes/en_mmanual.htm). 22. – Data of access : 23.07.2004.

17. Seibert, F.B. A study of certain problems in the use of standard tuberculin, fractionation of PPD, standardization of tuberculins, and the question of sensitization / F.B. Seibert, E.H. Dufour // American Review of Tuberculosis. – 1948. – Vol. 35. – P. 363–364.

18. Svenkerud, R. A Study of heat concentrated synthetyc medium tuberculin. Preparation, standardization and biologic activity. Thesis / R. Svenkerud. – Copenhagen: Munksgaard, 1955. – P. 25–28.

19. The tuberculin test / M.L. Monaghan [et al] // Vet. Microbiol. – 1994. – Vol. 40, № 1/2. – P. 111–124.

Summary

The tuberculin purified for mammals by BelVitunifarm and the tuberculin by Kursk boimufacture are equal in a simultaneous trial. For the highest diagnosis efficiency the tuberculin purified should be used in a dose of 5000 ME (2000 IU/ml) in herds (excluding the affected herds).

Рецензент – д. б. н., професор Куртяк Б.М.