

АЛЕРГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ТА МУРЧАКІВ З ВИКОРИСТАННЯМ ПРЕПАРАТУ «ППД-ТУБЕРКУЛІН ДЛЯ ССАВЦІВ ОЧИЩЕНИЙ»

О. В. Кассіч, аспірант*

А. Г. Левченко, к.вет.н., доцент**

В. Ю. Кассіч, д.вет.н., професор***

*Харківська державна зооветеринарна академія

**Одеський державний аграрний університет

***Сумський національний аграрний університет

Наведені матеріали алергічних досліджень контрольних груп великої рогатої худоби та мурчаків ППД-туберкуліном для ссавців очищеним з метою визначення активності і специфічності препарату. Дослідженнями встановлено, що виготовлена Херсонським державним підприємством – біологічна фабрика експериментальна серія ППД-туберкуліну для ссавців є активною, специфічною, відповідає вимогам ДСТУ 4664:2006 та придатна до використання (проведення алергічних досліджень). Активність випробовуваної серії туберкуліну становить: 49000 МО/мг.

Ключові слова: туберкулін очищений (ППД) для ссавців у стандартному розчині, мікобактерії, збудник туберкульозу, алергія, гіперчутливість сповільненого типу (ГЧСТ), виробничі штами.

Постановка проблеми у загальному вигляді. Для алергічних досліджень на туберкульоз в Україні використовують «Туберкулін очищений (ППД) для ссавців в стандартному розчині» ТУУ 24.00497087.645-2001, розроблений колективом авторів улабораторії туберкульозу ІЕКВМ (Кассіч Ю. Я., Завгородній А. І., Кассіч В. Ю.) [1, 2]. Препарат виготовляє Сумське державне підприємство – біологічна фабрика. Проте, у країнах Європейського співтовариства діє Директива Ради ЄС 97/12 від 17 березня 1997 р., згідно з якою туберкулінізацію тварин проводять з використанням туберкулінів PPD або HC5M, які повинні виготовлятися з штамів *M. bovis* «AN5» або «Valle», в той час як при виготовленні вітчизняного препарату, основним виробничим штамом є «*M. bovis* ІЕКВМ-1» [1-11]. Тому, нині актуальним напрямком досліджень є розробка, стандартизація та гармонізація з вимогам ЄС вітчизняних ППД-туберкулінів.

У зв'язку із вищесказаним, на Херсонському державному підприємстві – біологічна фабрика з використанням виробничого штаму *M. bovis* Valle (КМІЕВ-9 КМ) та технологічних прийомів мікрофільтрації та ультрацентрифугування розроблено та впроваджено у виробництво препарат «ППД-туберкулін для ссавців очищений».

Аналіз останніх досліджень та публікацій. В основі алергічних досліджень лежить феномен інфекційної алергії та гіперчутливість сповільненого типу (ГЧСТ). Інфекційна алергія – стан підвищеної чутливості організму до введення збуднику певної хвороби або продуктів його життєдіяльності. Настає інфекційна алергія через 2-3 тижні після зараження і найбільше виражена при туберкульозі, бруцельозі, сепі, туляремії для яких характерний хронічний перебіг та розвиток нестерильного імунітету. Стан інфекційної алергії використовують для прижиттєвої діагностики згаданих хвороб [1, 2, 4, 5, 6]. Туберкулінові реакції не є проявом алергії, оскільки алергічні реакції являють собою реакції миттєвого типу та обумовлені активацією В-систем лімфоцитів, розмноженням плазматичних клітин і продукцією специфічних антитіл.

Реакції на туберкулін являють собою класичний прояв імунологічного феномену гіперчутливості сповільненого типу. ГЧСТ є фактором клітинного імунітету. Реакція характеризується взаємодією сенсibiliзованих лімфоцитів з антигенами мікробної клітини та виділенням

медіаторів клітинного імунітету – лімфокинінів [1, 2, 4, 5, 6].

Нині для прижиттєвої діагностики туберкульозу тварин і птиці в Україні застосовують сухі очищені (ППД) туберкуліни для ссавців та птиці, а також алергени з атипичних мікобактерій: КАМ (виробництва Курської біологічної фабрики) або ААМ, що виготовляє Сумська біологічна фабрика (ці препарати є аналогами). Україна Європейського співтовариства діє Директива Ради ЄС 97/12 від 17 березня 1997 р., згідно з якою алергічні дослідження тварин проводять з використанням туберкулінів PPD або HC5M, які повинні виготовлятися з штамів *M. bovis* «AN5» або «Valle». При виготовленні вітчизняного препарату основним виробничим штамом є «*M. bovis* ІЕКВМ-1» [1-3, 6, 7]. У зв'язку із вищесказаним, на Херсонському державному підприємстві – біологічна фабрика з використанням виробничого штаму *M. bovis* Valle (КМІЕВ-9 КМ) та технологічних прийомів мікрофільтрації та ультрацентрифугування розроблено та впроваджено у виробництво препарат «ППД-туберкулін для ссавців очищений». Препарат використано для алергічних досліджень великої рогатої худоби та морських свинок у порівнянні з контрольним (еталонним) зразком.

Метою роботи було проведення алергічних досліджень тварин з використанням експериментальної серії № 2 (Е) ППД-туберкуліну для ссавців очищеного, виготовленого у червні 2016 року Херсонським державним підприємством – біологічна фабрика та аналіз їх результатів.

Матеріали і методи досліджень. Здоровій великій рогатій худобі віком близько 8 місяців у кількості 18 голів підшкірно у ділянці підгруддя вводили 5 мг зависі живої культури вакцини БЦЖ на стерильному фізіологічному розчині в об'ємі 5 см³. Велику рогату худобу використовували через 30 діб після щеплення. Під час алергічних досліджень тваринам вводили внутрішньошкірно в депільовані ділянки шкіри шиї, відповідно ліворуч та праворуч, по 0,1 см³ туберкуліну випробовуваної дослідної серії № 2 та контрольної серій туберкуліну. В якості контрольної використовували серію № 32 «Туберкулін очищеного (ППД) для ссавців у стандартному розчині», придатна до 09.2016 р. виробництва Сумського державного підприємства біологічна фабрика. Реакцію визначали через 72 год. і оцінювали за ступенем потовщення складки шкіри в місцях введення туберкуліну. Випробовувану серію вважали

активною, якщо немає різниці в інтенсивності зумовлених туберкулінами реакцій або вона статистично недостовірна.

Визначення активності дослідно-виробничої серії туберкуліну ППД для ссавців у порівнянні з контрольною серією туберкуліну проводили на 18 бичках через 30 діб після щеплення їх культурою БЦЖ на стерильному вазеліновому маслі. З лівого боку шиї тваринам внутрішньошкірно вводили ППД-туберкулін для ссавців випробовуваної серії, а з правого боку шиї – туберкулін контрольної серії у дозах по 0,1 см³ в попередньо вистрижені та дезінфіковані місця.

Результати власних досліджень. Облік алергічних реакцій проводили через 72 год після введення туберкулінів. Отримані результати вносили у відомість (табл. 1).

З матеріалів таблиці видно, що серед тварин, щеплених інактивованою культурою *M. bovis* Valle, на

туберкулін випробовуваної серії у порівнянні з препаратом контрольної серії реагували з більшою інтенсивністю реакцій \pm 10 голів, з меншою \pm 5 голів та з однаковою інтенсивністю \pm 3 голови.

Серед щеплених культурою БЦЖ тварин на туберкулін комерційної серії у порівнянні з контрольною реагували з більшою інтенсивністю реакцій \pm 8 голів, з меншою \pm 5 голів та з однаковою інтенсивністю \pm 5 голів худоби.

У несенсибілізованих мікобактеріями тварин алергічних реакцій на введення туберкуліну не виникало.

Різниця в інтенсивності реакцій на дослідну (6,9 \pm 0,8 мм) та контрольну (6,4 \pm 1,0 мм) серії статистичноне достовірна (P \geq 0,05).

Таблиця 1

Результати обліку алергічних реакцій на введення туберкуліну дослідної і контрольної серій у сенсibilізованої вакциною БЦЖ ВРХ

№ тварини	Потовщення складки шкіри(мм) у тварин, щеплених БЦЖ		Наявність більшої \pm , меншої \pm , однакової \pm реакції на туберкулін комерційної серії
	Дослідна серія	Контрольна серія	
1	3	4	-
2	негат.	негат.	=
3	7	5	+
4	3	1	+
5	10	10	+
6	14	9	+
7	7	5	+
8	7	1	+
9	негат.	негат.	=
10	6	10	-
11	4	5	-
12	19	19	=
13	10	7	+
14	8	10	-
15	5	3	+
16	8	8	=
17	9	13	-
18	4	4	=
Сума	124	114	
<i>M\pmm / P</i>	6,9 \pm 0,8	6,4 \pm 1,0	P \geq 0,05

Сенсибілізація мурчаків культурою БЦЖ. Десяти морським свинкам вводили по 1 мг зависі культури БЦЖ на стерильному ізотонічному розчині хлориду натрію в об'ємі 1 см³.

Всіх дослідних морських свинок використовували для визначення активності випробовуваної експериментальної серії № 1 ППД-туберкуліну для ссавців очищеного через 30 діб після щеплення.

Виготовлення розведень туберкуліну. Готували суміш з п'яти флаконів туберкуліну випробовуваної серії. 1 см³ туберкуліну переносили у пробірку з 9 см³ стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію й перемішували. З цієї пробірки 1 см³ розчину туберкуліну переносили у другу пробірку з 4 см³ стерильного ізотонічного розчину і таким чином отримували перше («1») розведення туберкуліну. З другої пробірки 1 см³ розчину туберкуліну переносили у пробірку з 9 см³ стерильного ізотонічного розчину й отримували друге («2») розведення туберкуліну.

Таким же методом готували розведення «3» та «4» контрольної серії туберкуліну, що містять у 1 см³ 1000 і 100

МО, відповідно.

Для виготовлення розведень контрольної серії туберкуліну використовували п'ять флаконів алергену з таким розрахунком, щоб у 1 см³ містилось 50000 МО.

Проведення випробування. Перед проведенням випробування (за 5 діб) шерсть по боках морських свинок вибривали. Виготовлені розведення алергенів (1, 2, 3, 4) вводили внутрішньо шкірно кожній морській свинці в депільовані ділянки шкіри в дозі 0,1 см³ по два розведення з кожної сторони тіла в умовні місця ін'єкцій: а, б, в, г. Відстань між місцями введення з кожної сторони тіла була не меншою 40 мм.

Кожне розведення туберкуліну вводили окремим шприцом, номер якого відповідає номеру розведення препарату. Шприці з набраним розчином розташовували на кришці стерилізатора за їх порядковими номерами (1, 2, 3, 4). Шкіру фіксували великим і вказівним пальцями, паралельно до її поверхні, голку вводили у шкіру свинки не менше, ніж на 3 мм. Потім шкіру відпускали і натиском на поршень повільно вводили 0,1 см³ розчину. У місці введення

утворювалась випуклість величиною з горошину. Для попередження витікання розчину голку після введення розчину затримували на 1-2 сек. у шкірі, а потім виймали.

Після ін'єкції розведення першій свинці перший шприц з цим розведенням клали у кінець рядка, за шприцом № 4. Решту шприців після введення розчинів алергенів клали на попередні місця. Ін'єкцію розчину туберкуліну другій свинці робили шприцом № 2, який потім клали праворуч за шприцом № 1. Решту шприців після введення

розчинів алергенів клали на попередні місця.

Таким чином, умовний номер кожної свинки відповідав номеру розведення, яке вводили цій свинці першим шприцом в умовне місце ін'єкції.

Кожну свинку після ін'єкції розведення туберкуліну мітили фарбою, що не змивається. Тварин, яким розведення туберкуліну вводили в одному порядку, мітили одною міткою. Порядок маркування і введення туберкуліну морським свинкам наведений у таблиці 2.

Таблиця 2

Порядок маркування і введення туберкуліну морським свинкам

№ свинки	Місце мітки	Розведення туберкуліну, що введені в умовні місця ін'єкції			
		ліворуч від голови		праворуч від голови	
		а	б	в	г
1	Мітка не наноситься	1	2	3	4
2	Голова	2	3	4	1
3	Спина	3	4	1	2
4	Крижі	4	1	2	3
5	Мітка не наноситься	1	2	3	4
6	Голова	2	3	4	1
7	Спина	3	4	1	2
8	Крижі	4	1	2	3
9	Мітка не наноситься	1	2	3	4
10	Голова	2	3	4	1

Інтенсивність реакції визначали через 24 год. після введення препаратів шляхом обліку діаметра папули, що виникла в місці введення туберкуліну. Для цього обводили чорнилом контур папули. Потім на бік тварини клали лист целофану та перемальовували на нього усі контури з позначенням місць ін'єкції: а, б, в, г.

На лист целофану перемальовували контури папул

усіх морських свинок групи з позначенням умовного номера кожної тварини. Для визначення активності туберкуліну лист целофану клали на міліметровий папір і вимірювали значення поперечного та поздовжнього діаметрів кожної папули. Обчислювали їх середню величину та результати заносили у таблицю 3.

Таблиця 3

Визначення активності туберкуліну на морських свинках, сенсibiliзованих культурою БЦЖ

№ свинки, розведення	Інтенсивність реакції на введення розведень туберкуліну (мм)			
	1	2	3	4
1	20,0	7,0	21,0	11,5
2	23,5	7,5	21,0	10,0
3	16,5	7,0	16,0	7,5
4	18,0	8,0	19,0	12,0
5	19,0	14,5	19,0	11,0
6	19,5	9,0	14,0	7,5
7	20,0	9,0	22,5	10,5
8	24,5	16,0	25,5	12,0
9	22,5	10,0	19,5	14,0
Всього:	183,5	88,0	179,5	98,0

Обчислювали суму середніх діаметрів папул випробовуваної серії туберкуліну (d_1) і суму середніх діаметрів папул на контрольну серію туберкуліну (d_2):

$$d_1 = 183,5 + 88,0 = 271,5 \text{ мм}$$

$$d_2 = 179,5 + 98,0 = 277,5 \text{ мм}$$

Активність випробовуваної серії туберкуліну:

$$A = \frac{271,5}{277,5} \cdot 50000 = 48916 \approx 49000 \text{ МО/мг},$$

де 50000 – кількість МО в 1 см³ основного розчину контрольної серії туберкуліну.

Активність випробовуваної серії туберкуліну становить: 49000 МО/мг. Згідно ДСТУ 4664:2006 активність препарату повинна складати 50000±15000 МО в 1 см³ основного розчину, т. ч. випробовувана серія препарату за активністю відповідає чинним вимогам.

Після роботи з живою культурою *M. bovis* штаму BCG приміщення та обладнання обробляли із застосуванням дезінфектанту «Бровадез-плюс», ефективність якого щодо мікобактерій визначена нами в попередніх дослідках [12, 13].

Висновки та пропозиції виробництву. На підставі проведених експериментів на ВРХ та мурчаках, щеплених культурою БЦЖ визначено, що випробовувана виготовлена Херсонським державним підприємством – біологічна фабрика дослідно-виробнича серія № 2 є активною специфічною, відповідає вимогам ДСТУ 4664:2006 та

придатна до проведення алергічних досліджень на туберкульоз. Активність випробовуваної серії туберкуліну становить: 49000 МО/мг. Різниця в інтенсивності реакцій на дослідну та контрольну серії не достовірна ($P \geq 0,05$).

Список використаної літератури:

1. Кассіч В. Ю. Мінливість мікобактерій, епізоотологічний моніторинг, заходи і засоби боротьби з туберкульозом тварин в умовах радіаційного впливу : автореф. ... док-ра. вет. наук : 16.00.03. Харків, 2004. 42 с.
2. Кассіч В. Ю. Мінливість мікобактерій, епізоотологічний моніторинг, засоби і заходи боротьби з туберкульозом тварин в умовах радіаційного впливу: Дис...д-ра.вет.наук: 16.00.03. Харків, 2004. 408 с.
3. Middleton A.M., Chadwick M.V., Nicholson A.G. (2002) Interaction of Mycobacterium tuberculosis with human respiratory mucosa Tuberculosis 82(2/3). P. 69-78.
4. Кассіч В. Ю., Жученко А. В. Гиперчувствительность замедленного типа и ее использование для диагностики бактериальных инфекций. *Вісник Сумського національного університету*.2008. № 9. С. 40-43.
5. Кассіч В. Ю., Овдиенко Н. П., Волосянко О. В., Нестеренко Т. Г. Аллергия и аллергическая диагностика инфекционных болезней. *Вет. біотехнологія*.Збірник статей міжнародної науково-практичної конференції. Київ, 2008, № 13, С. 123-128.
6. Naito M., Fukuda T., Sekiguchi K., Yamada T. The domains of human fibronectin mediating the binding of an antigen, the most immunopotent antigen of mycobacteria that induces protective immunity against mycobacterial infection. *Biochem J* 2000,№ 347,р. 725-731.
7. Пат. 57266 А Україна. Спосіб визначення активності туберкуліну очищеного (ППД) для птахів. Опубл. 16.06.2003.
8. Пат. 51326 А Україна. Туберкуліногенний штам із мікобактерій пташиного виду *M. avium* – ІЕКВМ УААН для виготовлення туберкуліну очищеного (ППД) для птиці. Опубл. 15.11.2002.
9. Jeevan A., Sharma A. K., McMurray D. N. Ultraviolet radiation reduces resistance to Mycobacterium tuberculosis infection in BCG-vaccinated guinea pigs. *Tuberculosis (Edinb.)*.2009. Vol. 89.P. 431-438.
10. Білушко В. В., Дегтярьов І. М. Порівняльне вивчення властивостей туберкулінів для ссавців, виготовлених за різними технологіями.*Пробл. зооінженерії та вет. медицини*. Матеріали міжнарод. наук. конф. (м. Харків, 27 – 30 нояб. 2005 г.). Харків, 2006. Вип. 13, Ч. 2. С. 51-55.
11. Завгородній А. І., Білушко В. В., Дегтярьов І. М. Оцінка ефективності експериментальних мікросерій туберкуліну для ссавців. *Зб. наук.праць*. Полтава, 2006. С. 110-115.
12. Кассіч В. Ю., Фотіна Т. І., Фотіна Г. А. Експериментальне випробування дезінфектанту бровадес-плюс щодо збудників туберкульозу. *Ветеринарна медицина України*. 2008. № 3. С. 39-40.
13. Кассіч В. Ю., Фотіна Т. І., Березовський А. В., Фотіна Г. А., Камбур М. Д., Кассіч О. В. Дезінфекція виробничих приміщень неблагополучних щодо туберкульозу господарств з використанням препарату «Бровадес-Плюс». *Вісник Сумського національного університету*. 2010. № 8. С. 42-44.

References:

1. Kassich V. U. (2004), Variability of mycobacteria, epizootic monitoring, means and measures to tackle tuberculosis of animals under radiation's exposure. [Mynlivist mikobakteriy, epizootychnuy monitoring, zasoby ta zakhodu borotbu z tuberculozom tvarun v umovah radiacyjnoho vplyvu],[avtoreferat]. 42 p. (in Ukraine)
2. Kassich V. U. (2004), Variability of mycobacteria, epizootic monitoring, means and measures to tackle tuberculosis of animals under radiation's exposure. [Mynlivist mikobakteriy, epizootychnuy monitoring, zasoby ta zakhodu borotbu z tuberculozom tvarun v umovah radiacyjnoho vplyvu]. [thethis]. 408 p. (in Ukraine)
3. Middleton A. M., Chadwick M. V. and Nicholson A. G. (2002), "Interaction of Mycobacterium tuberculosis with human respiratory mucosa Tuberculosis". 82(2/3). pp. 69-78.
4. Kassich V. Y. and Zhychenko A. V. (2008), "The hypersensitivity of delayed type and it used for bacterial infections" [Hyperchustvitelnost' zamedlennoho typu i ee ispolzovanie dlya diagnostiki bacterialnuh infekciy], *Bulletin of the Sumy National Agrarian University*, № 9, pp. 40-43. (in Ukraine)
5. Kassich V. Y., Ovdienko N. P., Volosyanko O. V. and Nesterenko T. H. (2008), "Allergy and allergic diagnosis of infectious diseases" [Allergiya i allergicheskaya diagnostica infekcionnuh bolezney], *Vet. Biotechnology: Materials of the international scientific-practical conference of Ukraine, Kyiv*, pp. 123-128. (in Ukraine)
6. Naito M., Fukuda T., Sekiguchi K. and Yamada T. (2000), "The domains of human fibronectin mediating the binding of a antigen, the most immunopotent antigen of mycobacteria that induces protective immunity against mycobacterial infection". *Biochem J*, № 347, pp. 725-731.
7. Pat. 57266 A Ukraine. A method of determination activity of purified tuberculin (PPD) for birds. Pubwished June 16, 2003.
8. Pat. 51326 A Ukraine. Tuberculinogen strain from *M. avium* mycobacteria – ІЕКВМ УААН for the production of purified tuberculin (PPD) for avium. Pubwished 15.11.2002.
9. Jeevan A., Sharma A. K. and McMurray D. N.(2009), "Ultraviolet radiation reduces resistance to Mycobacterium tuberculosis infection in BCG-vaccinated guinea pigs". *Tuberculosis (Edinb.)*.Vol. 89.pp. 431-438.
10. Bilyshko V. V. and Dehtyarov I. M. (2006), "Comparative study of the properties of tuberculins for mammals, manufactured by different technologies" [Porivnyalne vuvchennya vlastuvostey tuberculiniv dlya savciv, vugotovlenuh za riznumu tehnologiyamu], *Probl. zoengineering and vet. Medicine: Materials international Sc. Conf.*, Harkov, pp. 51-55. (in Ukraine)
11. Zavgorodniy A. I., Bilyshko V. V. and Dehtyarov I. M. (2006), "Estimation the effectiveness of experimental tuberculin microcircuits for mammals" [Ocinka efectuvnosti eksperimentalnuh mikroseriy tuberculiny dlya savciv], Abstracts of the Sc. Conf., Poltava, pp. 110-115. (in Ukraine)
12. Kassich V. U., Fotina T. I. and Fotina H. A. (2008), "Experimental test for disinfectant «Brovades plus» for tuberculosis activators" [Eksperimentalne vuprobuvannya dezinfictantu «Brovades-Plus» stosovno zbydnukiv tuberkulozy], *Veterinary Medicine of Ukraine*, № 3, pp. 39-40. (in Ukraine)
13. Kassich V. Y., Fotina T. I., Beresovskiy A. V., Fotina H. A., Kambyr M. D. and Kassich O. V. (2010), "Disinfection of industrial premises unsuccessful with tuberculosis farms using the drug «Brovades-Plus»" [Dezinfekciya vurobnuchuh prumiwen neblagopoluchnuh shodo tuberkulozy gospodarstv z vukorustanniam «Brovades-Plus»], *Bulletin of the Sumy National Agrarian University*, № 8, pp. 42-44. (in Ukraine)

Кассич А. В., Левченко А. Г., Кассич В. Ю. Аллергические исследования на туберкулёз крупного рогатого скота и морских свинок с использованием препарата «ППД-туберкулин для млекопитающих очищенный».

Приведены материалы аллергических исследований контрольных групп крупного рогатого скота и морских свинок ППД-туберкулином для млекопитающих очищенным с целью определения активности и специфичности препарата. Исследованиями установлено, что изготовленная Херсонским государственным предприятием – биологическая фабрика экспериментальная

серия ППД-туберкулина для млекопитающих является активной, специфичной, соответствует требованиям DSTU 4664:2006 и пригодна для использования (проведения аллергических исследований). Активность испытуемой серии туберкулина составляет: 49000 МЕ/мг.

Ключевые слова: туберкулин очищенный (ППД) для млекопитающих в стандартном растворе, микобактерии, возбудитель туберкулеза, аллергия, гиперчувствительность замедленного типа (ГЧЗТ), производственные штаммы.

Kassich O. V., Levchenko A. G., Kassich V. Yu. Allergic tuberculosis studies on cattle and guinea pigs using the drug "PPD-tuberculin for mammals cleared".

The results of allergic studies on cattle and guinea pigs test groups vaccinated by PPD-tuberculin purified for mammals, aimed to the drug's activity and specificity tests, have been presented. It was proved by research that experimental batch of PPD-tuberculin purified for mammals, produced by the Kherson State Enterprise - the biological factory, is active and specific, it satisfies the requirements of DSTU 4664:2006 and is suitable for allergic research.

Keywords: purified tuberculin (PPD) for mammals, mycobacteria, the causative agent of tuberculosis, tuberculin, allergy, hypersensitivity of delayed type, production strains.