

Подбор условий и критериев оценки биологической активности и специфичности аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий

Ю.М. Мясоедов, В.М. Безгин, В.Е. Козлов

ФКП «Курская биофабрика»

Контактная информация: Мясоедов Юрий Михайлович, MyasoedovYurij@yandex.ru

В соответствии с требованиями международной документации подобраны условия и критерии оценки биологической активности и специфичности аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий (КАМ). Показана целесообразность определения биологической активности КАМ на морских свинках, инфицированных смесью микобактерий *M. intracellulareae* и *M. scrofulaceum*. Показано, что определение показателя «специфичность КАМ» предпочтительнее осуществлять на морских свинках, инфицированных смесью микобактерий *M. intracellulareae* и *M. scrofulaceum*, и морских свинках, инфицированных *M. bovis*. Ценность исследования заключается в разработке биологических моделей и подборе доз КАМ, приемлемых для определения биологической активности и специфичности.

Ключевые слова: морские свинки, микобактерии, биологическая активность, специфичность, аллерген очищенный комплексный из атипичных микобактерий.

Введение

Туберкулёз животных является одним из распространённых инфекционных заболеваний, причиняющим значительный экономический ущерб животноводству и представляющим эпидемиологическую опасность для людей [3]. Скрининговым методом выявления инфицированных патогенными микобактериями животных является аллергическая проба с использованием ППД туберкулина для млекопитающих [9]. В ряде случаев, при постановке аллергической пробы на животных, инфицированных непатогенными микобактериями, возникают затруднения, обусловленные проявлением неспецифических реакций на ППД туберкулин для млекопитающих. В подобной ситуации последующее аллергическое исследование осуществляют с использованием ППД туберкулина

для млекопитающих и ППД туберкулина для птиц или аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий (КАМ) [5]. При этом использование аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий более выгодно в сравнении с применением ППД для птиц, так как первый имеет более широкий спектр антигенов атипичных микобактерий, циркулирующих на территории Российской Федерации [7].

Известно, что точность аллергического исследования напрямую определяется величиной биологической активности и специфичностью используемых аллергенов. Учитывая различия методик определения биологических характеристик аллергенов, используемых разными лабораториями, на международном уровне были разработаны критерии оценки и методы контроля для

ППД туберкулина для млекопитающих и ППД для птиц и предложены соответствующие эталоны [3, 8]. В то же время, для аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий Международных стандартов, а также условий и критериев оценки биологических параметров качества не разработано.

Целью исследования является подбор условий и критериев оценки величины биологической активности и специфичности аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий.

Материалы и методы

В исследовании были использованы 40 беспородных самок морских свинок массой 500 ± 100 г, одновременно полученных из ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, филиал «Андреевка». Животных содержали в вольерах на стандартном рационе кормления с использованием гранулированного корма.

Перед заражением морских свинок тестировали на туберкулез аллергическим способом с использованием 5 МЕ ППД туберкулина для млекопитающих [4].

В работе были использованы следующие виды микобактерий: бычьего вида - *M. bovis* штамм BCG; птичьего вида - *M. avium* штамм 2282; атипичные - *M. scrofulaceum* штамм N- 12C Non и *M. intracellulerae* штамм S- 13C Scoto. Микобактерии культивировали на картофельной среде Павловского в течение 25 суток, при температуре 37°C , после чего приготавливали суспензии на физиологическом растворе для инфицирования морских свинок:

- *M. bovis* штамм BCG – 0,2 мг/0,1 см³, внутривенно;

- *M. avium* штамм 2282 – 3 мг/0,5 см³, внутримышечно;

- смесь *M. scrofulaceum* штамм N- 12C Non и *M. intracellulerae* штамм S- 13C Scoto – по 0,5 мг/ 0,5 см³, внутримышечно.

Через 30 дней после инфицирования животные были использованы в опытах.

В исследовании были использованы следующие микобактериальные аллергены производства ФКП «Курская биофабрика»:

- туберкулин очищенный ППД для млекопитающих, эталонная серия;

- туберкулин очищенный ППД для птиц, эталонная серия;

- аллерген очищенный комплексный из атипичных микобактерий, производственная серия.

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили, используя следующие математические формулы:

- Логарифм относительной активности/специфичности препарата:

$$\lg R = \frac{(\bar{x}_{1\min} - \bar{x}_{2\min}) + (\bar{x}_{1\max} - \bar{x}_{2\max})}{Kb},$$

где \bar{x}_1 – величина ответной реакции (мм) на первый аллерген; \bar{x}_2 – величина ответной реакции (мм) на второй аллерген; K – сумма слагаемых в числителе; b – усреднённый тангенс угла наклона прямых к горизонтальной оси (прямых зависимости ответной реакции от логарифма дозы туберкулина).

- Усреднённый тангенс угла наклона прямых к горизонтальной оси:

$$b = \frac{(\bar{x}_{1\max} - \bar{x}_{1\min}) + (\bar{x}_{2\max} - \bar{x}_{2\min})}{2 \times (\lg d_{\max} - \lg d_{\min})},$$

где d – доза вводимого аллергена.

- Относительная активность/специфичность (R): $R = 10^{\lg R}$

Результаты и их обсуждение

Биологическую активность туберкулинов, изготовленных из *M. bovis*, *M. tuberculosis* и *M. avium*, определяют лабораторным способом на морских свинках, инфицированных теми видами микобактерий, из которых изготовлены аллергены [6]. Учитывая то, что КАМ является комплексным препаратом, в состав которого входят антигены микобактерий двух групп по классификации Ranyon (*M. scrofulaceum* – II группа и *M. intracellulerae* – III группа), определение величины «биологическая активность» предполагает подбор варианта инфицирования морских свинок и определение дозировок аллергенов, обеспечивающих диапазон приемлемых значений реакций от 8 до 25 мм, согласно требованиям МЭБ [9].

Вариантами выбора биологических моделей для определения биологической активности могут быть морские свинки, инфицированные микобактериями, из которых изготовлен КАМ, то есть смесь микобактерий *M. scrofulaceum* и *M. intracellulerae*, либо микобактериями, имеющими высокую степень гомологии с микобактериями, из которых приготовлен аллерген. Так, например, высокой степенью гомологии между антигенами микобактерий, ис-

пользуемых для приготовления КАМ, являются микобактерии *M. avium*, относящиеся к комплексу *M. avium – intracellulerae*. Использование животных, инфицированных *M. avium*, может явиться основой для определения эквивалента биологической активности КАМ в отношении ППД для птиц, и таким образом возможно стандартизовать КАМ в отношении Международного стандарта PPD-*avium*. Принимая во внимание вышеизложенное, подбор условий и критериев для оценки величины «биологическая активность» осуществляли на двух группах морских свинок: 1 – инфицированных смесью микобактерий *M. intracellulerae* и *M. scrofulaceum*; 2 – инфицированных *M. avium*.

В проведенных исследованиях были определены оптимальные значения доз КАМ – 20 и 2 Ед., а также ППД для птиц – 200 и 20 МЕ, обеспечивающие уровень кожной аллергической реакции от 8 до 25 мм, которые в последующем были использованы для определения величины «биологическая активность КАМ». Оценка вариантов осуществлялась по следующим показателям: значение относительной активности и доверительный интервал. Результаты исследования представлены в табл. 1.

Таблица 1

Определение биологической активности КАМ

Показатели	Группа № 3				Группа № 4			
	Смесь микобактерий <i>M. intracellulerae</i> и <i>M. scrofulaceum</i>				<i>M. avium</i>			
Препараты	КАМ		ППД пт.		КАМ		ППД пт.	
d	20 Ед.	2 Ед.	200 МЕ	20 МЕ	20 Ед.	2 Ед.	200 МЕ	20 МЕ
\bar{x}	18,8	10,6	18,7	10,9	16,7	9,7	19,1	14,14
n	10				10			
R	0,98				0,26			
д.и.	53-187				67-149			

Обозначения: d – доза препарата, \bar{x} – среднее значение кожной реакции ПЧЗТ, n – число животных, R – значение относительной активности, д.и. – доверительный интервал (при вероятности $p=0,95$), КАМ – аллерген очищенный комплексный из атипичных микобактерий, ППД пт. – туберкулин сухой очищенный для птиц.

Из полученных данных видно, что биологическая активность КАМ значимо выше в группе морских свинок, заражённых смесью *M. intracellulatae* и *M. scrofulaceum*, в сравнении с группой морских свинок, заражённых *M. avium*, $-0,98 > 0,26$, при соответствии границам доверительного интервала 50-200% в обоих случаях. Из этого следует, что данный вариант инфицирования морских свинок оказывает влияние на значение R, что обуславливает целесообразность определения биологической активности на морских свинках, зараженных смесью микобактерий *M. intracellulatae* и *M. scrofulaceum*, как наиболее гомологичной модели.

Исследованиями показано, что у микобактерий разных видов, используемых для изготовления микобактериальных аллергенов, в состав клеточной стенки входят родовые и видовые антигены, характеризующиеся сходствами и различиями биологических свойств [3]. Микобактериальные аллергены, в состав которых входит большое количество родовых антигенов, характеризуются низкой специфичностью, ограничивающей их использование для диагностики туберкулеза [1]. Поэтому современные технологии, применяемые при производстве микобактериальных аллергенов, позволяют значительно снизить концентрацию родовых антигенов при концентрировании видовых антигенов в готовом продукте, в т.ч. и при изготовлении аллергена КАМ [2].

Согласно требованиям международной нормативно-технической документации [8, 9], оценка специфичности ППД туберкулина для млекопитающих осуществляется на морских свинках,

инфицированных *M. avium*, а ППД туберкулина для птиц – на морских свинках, инфицированных *M. bovis*, то есть микобактериях, характеризующихся низкой степенью гомологии видовых антигенов в отношении используемого туберкулина. Таким образом, осуществляется косвенная оценка степени очистки аллергена от родовых антигенов, при этом показатель специфичности рассчитывается аналогично показателю «активность», но выражается в процентах.

Принимая во внимание вышеизложенное, следующим этапом исследования был подбор условий и критериев оценки специфичности КАМ.

Одним из обязательных условий при осуществлении дифференциально-диагностического исследования на туберкулёз у животных с ППД для млекопитающих и КАМ является использование таких дозировок, которые обеспечивают проявление более интенсивных аллергических реакций на ППД для млекопитающих в случае инфицирования патогенными микобактериями, при наличии менее интенсивных или отсутствии реакций на КАМ. Аналогичным образом проявляются более выраженные аллергические реакции на КАМ при наличии менее интенсивных или их отсутствии на ППД для млекопитающих при иницировании атипичными микобактериями. Принимая во внимание вышеизложенное, очевидно, что определение специфичности КАМ следует оценивать на морских свинках, инфицированных как смесью микобактерий *M. intracellulatae* и *M. scrofulaceum*, так и на морских свинках, инфицированных *M. bovis*.

В результате проведенных исследований были подобраны дозировки для определения показателя «специфичность КАМ», обеспечивающие уровень кожной аллергической реакции от 8 до 25 мм, на морских свинках, инфицированных смесью *M. intracellulatae* и *M. scrofulaceum*, – 40 Ед. и 4 Ед.; на морских свинках, инфицированных *M. bovis*, – 675 Ед. и 27 Ед. При определении показателя специфичности ППД для млекопитающих на морских свинках, инфицированных смесью *M. intracellulatae* и *M. scrofulaceum*, были использованы дозы 1000 и 100 МЕ, а на морских свинках, инфицированных *M. bovis*, – 25 и 1 МЕ, что также обеспечивает интенсивность кожных аллергических реакций от 8 до 25 мм. Оценка тестов осуществлялась по следующим показателям: значение относительной активности и доверительный интервал. Результаты исследования представлены в табл. 2.

Из полученных данных видно, что при использовании морских свинок,

инфицированных смесью атипичных микобактерий *M. intracellulatae* и *M. scrofulaceum*, процентное выражение специфичности КАМ соответствует двум, а при использовании группы морских свинок, инфицированных микобактериями *M. bovis*, показатель специфичности ППД для млекопитающих соответствует шести. В свою очередь, в нормативно-технической документации МЭБ и ЕС установлен показатель специфичности для ППД туберкулина для млекопитающих и ППД туберкулина для птиц, который не должен превышать 10%. Таким образом, показана целесообразность использованного подхода в реализации теста при определении специфичности. Результаты проведенных исследований явились основой при разработке тестов контроля показателей «величина», «биологическая активность» и «специфичность» аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий и были отражены в нормативной документации – СТО 00482909.

Таблица 2

Определение специфичности КАМ

Показатели	Группа № 1				Группа № 2			
	Смесь микобактерий <i>M. intracellulatae</i> и <i>M. scrofulaceum</i>				<i>M. bovis</i>			
Заражение								
Препараты	КАМ		ППД мл.		ППД мл.		КАМ	
d	40 Ед.	4 Ед.	1000 МЕ	100 МЕ	25 МЕ	1 МЕ	675 Ед.	27 Ед.
\bar{x}	13,56	8,88	13,56	10,25	17,75	13,15	17,45	11,55
n	10				10			
R (%)	0,02 (2,0%)				0,059 (5,9%)			
д.и.	50-200				50-197			

Обозначения: d – доза препарата, \bar{x} – среднее значение кожной реакции ПЧЗТ, n – число животных, R – значение относительной активности, д.и. – доверительный интервал (при вероятности $p=0,95$), КАМ – аллерген очищенный комплексный из атипичных микобактерий, ППД мл. – туберкулин сухой очищенный для млекопитающих.

Выводы

1. В соответствии с требованиями международной документации подобраны условия и критерии оценки биологической активности и специфичности аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий.

2. Показана целесообразность определения биологической активности аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий на морских свинках, инфицированных смесью микобактерий *M. intracellulatae* и *M. scrofulaceum*.

3. Показано, что определение показателя «специфичность» аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий предпочтительнее осуществлять на морских свинках, инфицированных смесью микобактерий *M. intracellulatae* и *M. scrofulaceum*, и морских свинках, инфицированных *M. bovis*.

Список литературы

1. **Безгин В.М.** Совершенствование промышленной технологии (ППД) туберкулина и его биохимическая характеристика / Дисс... канд. биол. наук. - М. 1990. 134 с.
2. **Безгин В.М., Козлов В.Е.** Новые технологии производства диагностических препаратов для ветеринарной медицины // Ветеринарная медицина: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. - Харків. 2003. № 81. С. 41-45.
3. **Кошечкин В.А., Иванова З.И.** Туберкулез. - М.: ГЭОТАР-Медиа. 2007. 302 с.
4. Методические наставления по проведению исследований при микобактериозах животных. - М. 2012. 85 с.
5. Наставление по диагностике туберкулеза животных. Утверждено Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ 18 ноября 2002 г. - М. 2002 г. 63 с.
6. **Фрадкин В.А.** Диагностические и лечебные аллергены. - М.: Медицина. 1990. С. 52-53.
7. **Шаров А.Н.** Аллергическая диагностика туберкулеза у животных: повышение её эффективности / Дисс... докт. вет. наук. - М.: 1990
8. European Pharmacopoeia, 4th ed. Council of Europe Strasbourg. 2002. P. 2088-2089.
9. OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th ed. 2012. Vol. 1. P. 683-695.

Selection of conditions and criteria of an estimation of biological activity and specificity of Purified Allergen of atypical mycobacterium

Yu.M. Myasoedov, V.M. Bezgin, V.E. Kozlov

According to the International Documentation requirements of the parameters and the criteria of the biological activity estimation and specificity of Purified Allergen of atypical mycobacterium weve found out. The expediency of definition of size biological activity of Purified Allergen of atypical mycobacterium on the guinea pigs infected with mixture of mycobacteria *M. intracellulatae* and *M. scrofulaceum* is shown. It is shown, that the definition of a parameter of Purified Allergen of atypical mycobacterium requires to carry out the specificity of the allergen on guinea pigs infected with a mixture of mycobacterium *M. intracellulatae* and *M. scrofulaceum* and the guinea pigs infected *M. bovis*. The main point of the research consists of in the development of biological models and selection of dozes of Purified Allergen of atypical mycobacterium for the definition of size biological activity and specificity.

Key words: guinea pigs, mycobacteria, biological activity, specificity, Purified allergen of atypical mycobacterium.