



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57266 (13) A

(51) 7 A61K39/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ТУБЕРКУЛІНУ ОЧИЩЕНОГО (ППД) ДЛЯ ПТАХІВ

1

2

(21) 2002064720

(22) 10 06 2002

(24) 16 06 2003

(46) 16 06 2003, Бюл. № 6, 2003 р.

(72) Завгородній Андрій Іванович, Кассіч Володимир Юрійович, Кассіч Юрій Якович

(73) Завгородній Андрій Іванович, Кассіч Володимир Юрійович, Кассіч Юрій Якович

(57) Спосіб визначення активності туберкуліну

очищеного (ППД) для птахів, що включає випробування виробничих серій препарату в порівнянні з контрольними на сенсibilізованих мікобактеріями пташиного виду морських свинках та обчислення активності препарату в міжнародних одиницях, який відрізняється тим, що для сенсibilізації тварин використовують культури атипичних мікобактерій *M intracellulare*, штам *M intracellulare* 78/98

Винахід, що передбачається, відноситься до ветеринарної мікробіології та біотехнології.

Існують способи визначення активності "Туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців" (ТУУ 24 4 00497087 645-2001) та "Туберкуліна сухого очищеного (ППД) для птиці" (ГОСТ 23881-79).

Активність туберкуліну (ППД) для ссавців та птахів в міжнародних одиницях (МО) визначають шляхом порівняння її з контрольними серіями препарату на морських свинках, сенсibilізованих культурою вакцинного штаму БЦЖ та збудника туберкульозу пташиного виду. Збудник туберкульозу культивується на живильних середовищах та в організмі лабораторних тварин, викликаючи сенсibilізацію їх до туберкулінів, близько чотирьох тижнів. Тому проведення випробувань з їх використанням досить тривале. При роботі із збудником туберкульозу не виключається можливість заносу їх у довкілля, зараження сприятливих тварин та людини, а тому потребує додаткових витрат для впровадження режимних заходів.

Таким чином, недоліками приведених способів контролю активності туберкуліну є те, що вони досить тривалі, а для їх виконання необхідно використовувати патогенні для людей, тварин та птиці збудники туберкульозу.

В основу винаходу, що передбачається, поставлено задачу розробити СПОСІБ визначення активності туберкуліну очищеного (ППД) для птахів, що включає випробування препарату в порівнянні з контрольними серіями на сенсibilізованих збудником туберкульозу пташиного виду лабораторних тваринах та обчислення активності препарату в міжнародних одиницях шляхом використан-

ня культури атипичних мікобактерій *M intracellulare*, штам *M intracellulare* 78/98, щоб забезпечити спосіб визначення активності туберкуліну очищеного (ППД) для птахів.

Для виконання поставленого завдання в якості культур тест-штамів при контролі активності туберкуліну очищеного (ППД) для птахів замість *M avium* IEKBM використовували не патогенні для тварин культури атипичних мікобактерій *M scrofulaceum* (31/82) та *M intracellulare* (78/98).

Приклади визначення активності туберкуліну очищеного (ППД) для птахів у стандартному розчині.

Дослід №1 Морські свинки (10 голів) сенсibilізовані *M avium* IEKBM. Дослід №2 Морські свинки (10 голів) сенсibilізовані *M intracellulare* 78/98.

Дослід №3 Морські свинки (10 голів) сенсibilізовані *M scrofulaceum* 31/82.

Активність ППД туберкуліну для птахів визначали із застосуванням наступних приладів та реактивів.

шприци скляні з бігунком ємністю 1 - 2 см³ за ГОСТ 22967,

голки ін'єкційні №0415,

піпетки градуйовані за ГОСТ 29228,

фарба для мітки,

целофан,

міліметровий папір,

культура збудника туберкульозу пташиного виду (*M avium* IEKBM),

культура атипичних скотохромогенних (*M scrofulaceum*) мікобактерій,

культура атипичних нефотохромогенних мікобактерій (*M intracellulare*),

(13) A

(11) 57266

(19) UA

натрій хлористий за ГОСТ 4233,
спирт етиловий ректифікований 70%-вий роз-
чин за ГОСТ 5962,

вода дистильована за ГОСТ 6709,
туберкулін для птахів контрольної серії,
30 морських свинок-альбіносів або з білими
боками масою 400 - 500г кожна

Підготовка до випробування
Сенсибілізація морських свинок

Морським свинкам роздільно (по десять тва-
рин на кожну культуру) внутрішньом'язево з внут-
рішньої сторони стегна щепили живих культур міко-
бактерій пташиного виду та атипових
(*M intracellulare*, *M scrofulaceum*) в дозі 1мг в об'ємі
1см³. Морських свинок, щеплених різними культу-
рами мікобактерій, утримували окремими групами

На щеплених (сенсибілізованих) мікобактерія-
ми морських свинок протягом 6 місяців виконували
не більше трьох дослідів з інтервалом у чотири
тижні між дослідженнями

За добу перед проведенням випробувань ту-
беркуліна на боках тварин (ліворуч та праворуч)
вищипували або вибривали волосся

Виготовлення розведень туберкуліну

З п'яти флаконів (ампул) випробовуваної серії
готували суміш туберкуліну. Для цього з кожного
флакону (ампули) стерильною піпеткою відбирали
1см³ препарату й переносили в одну бактеріологі-
чну пробірку та ретельно змішували. З пробірки
відбирали 1см³ суміші туберкуліну й переносили в
другу пробірку з 9см³ фізіологічного розчину. Та-
ким чином отримували основний розчин випробу-
ваної серії туберкуліну. З основного розчину від-
бирали 1см³ й переносили у пробірку з 4см³ фізіо-
логічного розчину. Таким чином одержували пер-
ше розведення (1/50) туберкуліну

З пробірки із першим розведенням відбирали
1см³ й переносили у пробірку з 9см³ стерильного
фізіологічного розчину. Таким чином одержували
друге розведення (1/500) туберкуліну

Розведення 1 і 2 еквівалентні 100 й 10 МО в
1см³ (їх позначали номерами 1 та 2)

Розведення контрольної серії туберкуліну про-
водили аналогічно. З трьох флаконів (ампул) кон-
трольної серії туберкуліну таким же чином готували
розведення 1/50 та 1/500 з утриманням в 1см³ 100
та 10 МО відповідно, позначивши їх номерами 3 та
4

Проведення випробування

Розведення випробовуваної та контрольної
серій туберкулінів окремо внутрішньошкірно вво-
дили кожній морській свинці в депільовані ділянки
шкіри в об'ємі 0,1см³ по два розведення з кожної
сторони тіла (ліворуч і праворуч), умовно позначи-
вши місця ін'єкцій символами "А", "Б", "В", "Г"
(табл. 1)

Відстань між введеними розведеннями тубер-
куліну з однієї сторони тіла була не менше 40мм

Кожне розведення туберкуліну вводили окре-
мим шприцом, номер якого відповідає номеру роз-
ведення препарату. Шприци з набраним розчином
розташовували на кришці стерилізатора за їх по-
рядковими номерами (1, 2, 3, 4). Шкіру фіксували
великим та вказівним пальцями, паралельно до її
поверхні. Голку вводили у шкіру свинки не менш

ніж на 3мм. Потім шкіру відпускали і натиском на
поршень повільно вводили 0,1см³ розчину. В місці
введення повинна виникати випуклість величиною
з горошину. Для попередження виткання розчину
голку після введення затримували на декілька се-
кунд у шкірі, а потім виймали

Після ін'єкції розведення першої свинці, шприц
з цим розведенням клали у кінець рядка за шприц
№4. Решту шприців після введення розчинів алер-
гену клали на попередні місця

Ін'єкцію розчину алергену другий свинці робили
шприцом №2, який потім клали праворуч, за
шприц №1. Решту шприців після введення розчи-
нів алергенів клали на попередні місця

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

Кожну свинку після ін'єкцій їй розведень тубе-
ркуліну митили фарбою, що не змивається. Тварин,
яким розведення туберкуліну вводили в одному
порядку, митили одною міткою

Порядок ін'єкцій розведень і мітки свинок на-
ведені в таблиці 1

Обробка результатів

Інтенсивність реакції визначали через 24 го-
дини після введення препаратів шляхом обліку
діаметру папули, що утворилась в місці введення
туберкуліну. Для цього обводили чорнилом контур
папули. Потім на бік тварини клали лист целофану
й перемальовували на нього всі контури з позна-
ченням місць ін'єкцій А, Б, В, Г

Для визначення активності туберкуліну лист
целофану клали на міліметровий папір, вимірюва-
ли значення поперечного та подовжного діамет-
рів кожної папули. Обчислювали їх середню вели-
чину, й результати заносили в таблицю 2

При обробці результатів випробування врахо-
вували лише свинок, які реагували на всі розве-
дення туберкуліну. Для визначення активності
препарату кількість морських свинок, які реагували
на всі розведення туберкуліну, повинна бути не
менше п'яти

Результати обліку алергічних реакцій на вве-
дення чотирьох розведень виробничої серії тубер-
куліну очищеного (ППД) для птахів морським свин-
кам сенсибілізованим *M avium*, *M intracellulare* та
M scrofulaceum наведені в таблиці 2

Активність туберкуліну (А) в Міжнародних оди-
ницях (МО) обчислювали за формулою

$$A = \frac{d_1}{d_2} \times 50000$$

де d_1 - сума середніх діаметрів папул на ви-
пробовувану серію, мм,

d_2 - сума середніх діаметрів папул на контро-
льну серію туберкуліну, мм,
50000 - вміст МО у 1см³ основного розчину ко-
нтрольної серії туберкуліну

Приклад 1. Визначали суми середніх діаметрів
папул на випробовувану серію туберкуліну (d_1) і
суму діаметрів пухлин на контрольну серію тубер-
куліну (d_2) на морських свинках сенсибілізованих
M avium,

$$d_1 = 204,0 + 98,0 = 302,0$$

$$d_2 = 209,0 + 106,0 = 315,0$$

Активність випробовуваної серії туберкуліну (А)

при проведенні контролю з використанням сенсibilізованих *M avium* морських свинок

$$A = (302 - 315) \times 50000 = 49999 \text{ 50000 МО/мг}$$

де 50000 - вміст МО в 1 см³ основного розчину контрольної серії туберкуліну

Приклад 2 Визначали суми середніх діаметрів папул на випробовувану серію туберкуліну (d_1) і суму діаметрів пухлин на контрольну серію туберкуліну (d_2) на морських свинках сенсibilізованих *M intracellulare*

$$d_1 = 203,1 + 98,0 = 301,1$$

$$d_2 = 213,0 + 96,7 = 309,7$$

Активність випробовуваної серії туберкуліну (A) при проведенні контролю з використанням сенсibilізованих *M intracellulare* морських свинок

$$A = (301,1 - 309,7) \times 50000 = 49999 \text{ 50000 МО/мг}$$

де 50000 - вміст МО в 1 см³ основного розчину контрольної серії туберкуліну

Приклад 3 Визначали суми середніх діаметрів папул на випробовувану серію туберкуліну (d_1) і суму діаметрів пухлин на контрольну серію туберкуліну (d_2) на морських свинках сенсibilізованих *M scrofulaceum*

$$d_1 = 182,5 + 87,0 = 269,5$$

$$d_2 = 181,5 + 95,0 = 276,5$$

Активність випробовуваної серії туберкуліну (A) при проведенні контролю з використанням сенсibilізованих *M scrofulaceum* морських свинок

$$A = (269,5 - 276,5) \times 50000 = 48734 \text{ 49000 МО/мг}$$

де 50000 - вміст МО в 1 см³ основного розчину контрольної серії туберкуліну

При проведенні контролю активності туберкуліну для птахів на морських свинках, сенсibilізованих *M intracellulare* (приклад 2) та *M scrofulaceum* (приклад 3) результати обчислення активності препарату в МО вірогідно не відрізняються від результатів, одержаних у прикладі 1 при використанні для сенсibilізації тварин *M avium* (розбіжність результатів статистично не достовір-

на між прикладами 1 та 2 ступінь достовірності становить ($P < 0,05$), між прикладами 1 та 3 дорівнює ($P = 0,05$)

Одержані результати свідчать про можливість використання для визначення активності препарату тварин, сенсibilізованих не збудником туберкульозу пташиного виду (*M avium*), а атиповими (не патогенними для людей та тварин) мікобактеріями, що робить дослідження екологічно безпечним. За результатами статистичного аналізу, мінімальна розбіжність в результатах розрахунку активності туберкуліну відзначена між прикладами 1 та 2 при використанні тварин сенсibilізованих *M avium* та *M intracellulare*. Тому для сенсibilізації тварин при визначенні активності очищеного туберкуліну (ППД) для птахів крім (або замість) *M avium* доцільно використовувати культуру атипових нефотохромогенних мікобактерій виду *M intracellulare*.

Таблиця 1

Місце мтки	Розведення туберкулінів, введених в умовні місця ін'єкцій			
	ліворуч від голови		праворуч від голови	
	А	Б	В	Г
Мітка наноситься	1	2	3	4
Голова	2	3	4	1
Спина	3	4	1	2
Крестець	4	1	2	3
Мітка не наноситься	1	2	3	4
Голова	2	3	4	1
Спина	3	4	1	2
Крестець	4	1	2	3
Мітка не наноситься	2	2	3	4
Голова	2	3	4	1

Таблиця 2

Умовний номер свинки	Інтенсивність реакції на введення розведень туберкулінів (мм)											
	I			II			III			IV		
	Сенсibilізовані			Сенсibilізовані			Сенсibilізовані			Сенсibilізовані		
	<i>M avium</i>	<i>M intracellulare</i>	<i>M scrofulaceum</i>	<i>M avium</i>	<i>M intracellulare</i>	<i>M scrofulaceum</i>	<i>M avium</i>	<i>M intracellulare</i>	<i>M scrofulaceum</i>	<i>M avium</i>	<i>M intracellulare</i>	<i>M scrofulaceum</i>
1	20,5	19,7	20,0	8,0	8,7	8,0	20,0	20,2	20,0	10,5	8,3	10,0
2	24,0	23,8	24,5	7,5	6,9	7,5	22,5	22,7	22,0	11,5	6,4	12,0
3	15,5	16,5	15,0	9,0	10,4	9,0	16,0	17,1	16,5	7,5	10,6	7,3
4	17,0	16,7	17,5	10,0	9,5	10,0	21,5	15,4	21,5	13,0	9,9	13,2
5	20,0	19,5	19,5	11,5	10,9	11,5	18,0	19,8	18,0	10,0	10,1	10,5
6	18,5	20,3	19,0	9,0	10,8	9,5	14,0	17,9	15,0	8,5	10,4	8,0
7	21,0	19,9	20,5	11,0	10,4	10,5	22,5	22,1	21,5	10,0	10,7	10,0
8	25,5	22,6	26,0	11,0	10,3	11,0	27,5	24,9	-	11,0	10,1	11,0
9	21,5	24,7	20,5	11,0	10,5	10,0	27,5	29,8	26,0	11,0	10,9	-
10	20,5	19,8	-	10,0	9,6	-	19,5	23,1	21,0	13,0	9,3	13,0
Ітого	204,0	203,1	202,4	98,0	98,0	87,0	209,0	213	181,5	106	96,7	95,0

