

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный научный центр - Всероссийский научно - исследовательский  
институт экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. Р.  
Коваленко Российской академии наук»**

**На правах рукописи**

**МЯСОЕДОВ ЮРИЙ МИХАЙЛОВИЧ**

**МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ АЛЛЕРГЕНЫ - СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ  
МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА И СПОСОБОВ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ  
АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА И  
ПАРАТУБЕРКУЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

**4.2.3 – инфекционные болезни и иммунология животных**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание ученой степени доктора биологических наук**

**Научные консультанты:**

**Доктор ветеринарных наук, профессор,  
заслуженный ветеринарный врач РФ  
Найманов Али Хусинович.**

**Доктор биологических наук  
Ездакова Ирина Юрьевна**

**Москва – 2023**

## Оглавление

<b>1. ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>6</b>
1.1. АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	6
1.2. СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ ТЕМЫ.....	9
1.3. ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	11
1.4. НАУЧНАЯ НОВИЗНА.....	12
1.5. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ.....	14
1.6. МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	15
1.7. ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ.....	16
1.8. СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	16
1.9. ПУБЛИКАЦИЯ МАТЕРИАЛОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	17
1.10. ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА В ПРОВЕДЁННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ..	18
1.11. ОБЪЁМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ.....	19
<b>2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>20</b>
2.1. МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ АЛЛЕРГЕНЫ: ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ АЛЛЕРГЕНОВ.....	20
2.2. ИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРИ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ ЖИВОТНЫХ .....	26
2.3. РАЗВИТИЕ МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ АЛЛЕРГЕНОВ.....	33
2.4. АЛЛЕРГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ И ЕЁ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ БОРЬБЫ С ТУБЕРКУЛЁЗОМ ЖИВОТНЫХ.....	43
2.5. ПРОБЛЕМА НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ПРИ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЁЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ.....	53
2.6. ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ ПААРТУБЕРКУЛЁЗА, СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПАРАТУБЕРКУЛЁЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА.....	56

<b>3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>62</b>
<b>3.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>62</b>
3.1.1. <i>Материалы.....</i>	<i>62</i>
3.1.2. <i>Методы исследований.....</i>	<i>65</i>
<b>4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>69</b>
4.1. <b>СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ                    УСЛОВИЙ                    ОЦЕНКИ</b>	
<b>ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ</b>	
<b>АЛЛЕРГЕНОВ.....</b>	<b>69</b>
4.1.1. <i>Изучение сенсibiliзирующих свойств микобактерий M. bovis.....</i>	<i>69</i>
4.1.2. <i>Изучение сенсibiliзирующих свойств микобактерий M. avium.....</i>	<i>73</i>
4.1.3. <i>Изучение сенсibiliзирующих свойств атипичных микобактерий.....</i>	<i>77</i>
4.2. <b>ИЗУЧЕНИЕ ФАКТОРОВ ОЦЕНКИ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ</b>	
<b>ПАРАМЕТРОВ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ АЛЛЕРГЕНОВ, ПРИ</b>	
<b>РАЗЛИЧНЫХ ДОЗИРОВКАХ.....</b>	<b>83</b>
4.2.1. <i>Определение эквивалентных оптимальных дозировок ППД туберкулина</i>	
<i>для млекопитающих.....</i>	<i>83</i>
4.2.2. <i>Определение эквивалентных оптимальных дозировок ППД туберкулина</i>	
<i>для птиц.....</i>	<i>88</i>
4.2.3. <i>Определение эквивалентных оптимальных дозировок</i>	
<i>КАМ.....</i>	<i>91</i>
4.3. <b>СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ                    БИОЛОГИЧЕСКОЙ                    МОДЕЛИ</b>	
<b>МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ ЖИВОТНЫХ .....</b>	<b>94</b>
4.3.1. <i>Оценка биологической активности ППД туберкулина для</i>	
<i>млекопитающих на различных биологических моделях.....</i>	<i>94</i>
4.3.2. <i>Разработка практических подходов для формирования групп морских</i>	
<i>свинок при оценке иммунобиологических параметров микобактериальных</i>	
<i>аллергенов.....</i>	<i>99</i>
4.3.3. <i>Определение оптимального времени учета кожной реакции ГЗТ при</i>	
<i>постановке туберкулинового теста у морских свинок.....</i>	<i>106</i>

4.3.4. Определение кратности использования сенсibilизированных морских свинок для оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов.....	109
4.3.5. Определение оптимальной диагностической дозы ППД туберкулина для млекопитающих при постановке биологической пробы на морских свинках.....	111
4.3.6. Изучение иммунных механизмов формирования туберкулиновой гиперчувствительности у морских свинок.....	114
4.4.                  СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ                  ТЕСТОВ                  ОЦЕНКИ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ АЛЛЕРГЕНОВ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ.....	119
4.4.1. Разработка инструментальных средств оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов.....	119
4.4.2. Разработка программного обеспечения определения иммунобиологических параметров качества микобактериальных аллергенов.....	123
4.4.3. Совершенствование способов оценки иммунобиологических параметров комплексных аллергенов.....	126
4.4.3.1. Совершенствование способа оценки биологической активности КАМ.....	126
4.4.3.2. Совершенствование способа оценки специфичности КАМ.....	129
4.5. ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ АЛЛЕРГЕНОВ ДЛИТЕЛЬНОГО ПЕРИОДА ХРАНЕНИЯ .....	134
4.6. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ КОМПЛЕКСНОГО АЛЛЕРГЕНА ИЗ АТИПИЧНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В СИМУЛЬТАННОЙ ПРОБЕ С ППД ТУБЕРКУЛИНОМ ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ.....	147
4.6.1. Разработка технологии изготовления комплексного аллергена «Параавиум» и методик оценки его активности и специфичности.....	152



4.6.2. Разработка биологической модели воспроизведения ГЗТ на морских свинках, усилением сенсibiliзирующих свойств микобактерий для дифференциации <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> от других видов микобактерий.....	158
<b>5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>168</b>
<b>6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>188</b>
<b>7. ВЫВОДЫ.....</b>	<b>189</b>
<b>8. ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ .....</b>	<b>192</b>
<b>9. РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....</b>	<b>194</b>
<b>10. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>196</b>
<b>11. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>198</b>
<b>12. ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>	<b>248</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### 1.1. Актуальность темы исследования

Среди инфекций крупного рогатого скота туберкулёз и паратуберкулёз являются наиболее распространёнными. Указанные заболевания характеризуются значительными финансовыми затратами, кроме того туберкулёз представляет собой серьёзную проблему здравоохранения [127].

Туберкулёз – сложное заболевание, в отношении которого до настоящего времени не разработаны высокоэффективные терапевтические и профилактические средства. Поэтому, ключевым этапом при осуществлении профилактических и оздоровительных мероприятий является диагностика болезни (ранее выявление и санитарный убой инфицированных животных).

Интрадермальная туберкулиновая проба, предполагающая использование туберкулина для млекопитающих, является скрининговым, прижизненным методом диагностики заболевания. При этом использование туберкулиновой пробы, в зависимости от эпизоотического статуса животноводческого хозяйства, характеризуется не одинаковой диагностической ценностью. Так в благополучных и неблагополучных по туберкулёзу хозяйствах, могут регистрироваться неспецифические реакции, или же отсутствовать реакции у инфицированных животных, в неблагополучных хозяйствах [132].

По этой причине, прижизненная диагностика туберкулеза крупного рогатого скота, с использованием лишь одной внутрикожной туберкулиновой пробы не может быть единственным и идеальным диагностическим средством. Диагностика должна быть комплексной – с применением внутрикожной туберкулиновой пробы с ППД туберкулином для млекопитающих, и других дополнительных методов [153, 156].

Эпизоотический анализ по туберкулёзу крупного рогатого скота в Российской Федерации, в настоящее время демонстрирует позитивную динамику - уменьшение числа неблагополучных пунктов. При этом, значимо повышается частота выявления животных с неспецифическими реакциями на ППД для млекопитающих. Так, например, в агропромышленном секторе России, за период 2001 - 2021 гг. всего было выявлено 868912 животных положительно реагирующих на ППД туберкулин для млекопитающих. При этом 90,9% особей выявлено в хозяйствах благополучных по туберкулёзу и только 9,1% особей зарегистрировано в неблагополучных хозяйствах, что характеризуют актуальность дифференциации неспецифических реакций [221].

Приведенные доводы являются основанием, для разработки комплексного аллерегена из атипичных микобактерий для дифференциации неспецифических реакций, что в свою очередь является ключевой и актуальной проблемой аллергической диагностики туберкулеза.

При паратуберкулезе животных также нет высокоэффективных методов диагностики, лечения и вакцинопрофилактики. Кроме того, сдерживающим звеном, в разработке способов диагностики паратуберкулёзной инфекции, является отсутствие соответствующей лабораторной модели. Так в результате многочисленных исследований, не удалось воспроизвести паратуберкулёз на лабораторных животных [263].

В последние годы, в связи с реализацией приоритетного национального проекта России «Развитие АПК», осуществляется импорт высокопродуктивного крупного рогатого скота, из аграрно развитых стран. В такой ситуации значимость аллергической диагностики паратуберкулёза возросла и характеризуется актуальностью.

Согласно современным исследованиям, при проведении диагностических исследований на паратуберкулёз не разработан метод с абсолютной диагностической эффективностью, что в свою очередь обуславливает необходимость использования комплекса методов [169].

В «Кодексе здоровья наземных животных МЭБ» 28 издании указано, что в отношении паратуберкулёза животных, в качестве альтернативных методов могут быть использованы либо иммуноферментный анализ, либо аллергическая проба.

При аллергической диагностике паратуберкулеза различные авторы использовали либо ионин (паратуберкулин), изготовленный из микобактерий паратуберкулеза, либо туберкулины для птиц, изготовленные только из микобактерий туберкулеза птичьего вида.

Некоторые авторы указывают, что ППД для птиц, максимально эффективен при исследовании животных, сенсibilизированных микобактериями комплекса *M. avim – intracellulae*, вследствие достаточно высокой видовой специфичности. При инфицировании животных другими видами микобактерий дифференцирующие свойства этого аллергена снижаются. Увеличение результативности дифференциальной алергодиагностики может быть обусловлено использованием комплексного аллергена в состав, которого входят белковые фракции микобактерий птичьего вида, а также белковые производные других видов микобактерий, преимущественно сенсibilизирующие животных, в условиях их содержания [44, 243].

Изложенное является обоснованием конструирования нового комплексного аллергена для аллергической диагностики паратуберкулеза, тем более что в доступной литературе имеются противоречивые сведения о диагностической ценности моновидовых аллергенов, изготовленных только из микобактерий птичьего вида или микобактерий паратуберкулеза.

Для аллергической диагностики микобактериальных инфекций используют различные виды аллергенов, качество которых имеет определяющее значение. Несмотря на длительность использования методик контроля их качества, некоторые проблемы до настоящего времени не разрешены. Так, не определены эквивалентность доз микобактериальных суспензий и доз микобактериальных аллергенов, не разработаны различные подходы нивелирования погрешностей при изучении иммунобиологических характеристик туберкулинов. Не подобраны оптимальные режимы использования лабораторных

моделей микобактериальных инфекций животных. При конструировании комплексных аллергенов не отработаны методические подходы оценки параметров качества, не решены вопросы моделирования паратуберкулёзной инфекции на лабораторных животных.

В связи с изложенным, на современном этапе борьбы с микобактериальными инфекциями, актуальным, характеризующимся научным и практическим значением, является изготовление новых, высоко специфических аллергенов, сравнительное изучение их свойств, совершенствование методических подходов, при контроле параметров качества, способов и методов применения в практических условиях, в соответствии современных Международных требований.

## 1.2. Степень разработанности темы

Для осуществления мероприятий по оздоровлению, и мероприятий по профилактике туберкулёза и паратуберкулёза крупного рогатого скота используется аллергический метод, предполагающий использование следующих туберкулинов:

- туберкулин очищенный (ППД) для млекопитающих - микобактериальный аллерген для диагностики туберкулёза животных. Изготавливается из микобактерий бычьего вида, штамм AN-5, производственная площадка - ФКП «Курская биофабрика»

-туберкулин очищенный (ППД) для птиц - аллерген для диагностики туберкулёза птиц, диагностики паратуберкулёза крупного рогатого скота, дифференциации неспецифических реакций на туберкулин у крупного рогатого скота и свиней в симультанной пробе. Изготавливается из микобактерий птичьего вида, штамм 22-82, производственная площадка - ФКП «Курская биофабрика»

-аллерген очищенный комплексный из атипичных микобактерий - аллерген для симультанной пробы у крупного рогатого скота. Изготавливается из

атипичных микобактерий *M. scrofulaceum*, штамм N-12, *M. Intracellulare*, штамм S-13, производственная площадка - ФКП «Курская биофабрика»

Эффективность аллергической диагностики микобактериальных инфекций животных определяется многими составляющими, в том числе методиками контроля качества препаратов. В настоящее время регламентированных способов оценки их качества, позволяющих оценивать диагностическую ценность аллергической пробы, более десятка. К основным параметрам относятся: биологическая активность, специфичность и реактогенность [274, 276].

Изучение иммунобиологических критериев туберкулинов, в лабораторных условиях, на морских свинках включает: подготовительные этапы и этапы постановки теста, которые влияют на результат исследования [8, 89, 97].

От момента изобретения туберкулина Робертом Кохом, и до настоящего времени разрабатываются новые аллергены, совершенствуются существующие и выводятся из применения туберкулины с недостаточной диагностической эффективностью. Подобные изменения связаны с усовершенствованием технологий изготовления и появлением новых данных, что позволяет формировать Международные требования к качеству микобактериальных аллергенов.

Вместе с тем в международной нормативной документации многие критерии, связанные с контролем микобактериальных аллергенов, не оценены, а некоторые требования носят рекомендательный характер, без определения предпочтительности того или иного варианта [136]. Кроме того, в различных лабораториях, проводятся работы связанные с созданием новых аллергодиагностикомов и совершенствованием существующих, в отношении которых не разработаны соответствующие международные нормативные требования [324].

Перечисленное является основанием для совершенствования методик контроля качества микобактериальных аллергенов, в соответствии с требованиями Международной нормативной документации, а также разработка методик контроля в отношении новых аллергодиагностикомов.

В связи с необходимостью совершенствования аллергической диагностики туберкулеза и паратуберкулеза животных необходима разработка новых комплексных аллергенов, а также способов их применения.

### 1.3. Цель и задачи исследований

Целью исследования являлось: совершенствование аллергенов, методических подходов и параметров контроля качества и способов применения микобактериальных аллергенов, для аллергической диагностики туберкулеза и паратуберкулеза крупного рогатого скота.

В задачи исследований входило:

1. Определить оптимальные варианты сенсibilизации морских свинок *M. bovis*, *M. avium* и атипичными микобактериями, для оценки иммунобиологических критериев туберкулинов.

2. Определить эквивалентные оптимальные дозировки ППД для млекопитающих, ППД для птиц и КАМ и временные интервалы развития реакции ГЗТ, для оценки иммунобиологических параметров.

3. Провести сравнительную оценку биологической активности ППД для млекопитающих на сенсibilизированных *M. bovis* морских свинках и на инфицированном *M. bovis* крупном рогатом скоте.

4. Определить оптимальную диагностическую дозу ППД туберкулина для млекопитающих, при постановке биопробы на морских свинках.

5. Изучить иммунные механизмы формирования состояния ГЗТ и развития туберкулиновой реакции у морских свинок.

6. Разработать техническое устройство оценки аллергических реакций у сенсibilизированных морских свинок, на микобактериальные аллергены и программное обеспечение статистического расчета величины иммунобиологических параметров.

7. Определить оптимальные параметры оценки иммунобиологических характеристик активности и специфичности комплексного аллергена из атипичных микобактерий.

8. Изучить стабильность иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов, после длительного периода хранения.

9. Разработать комплексный аллерген из атипичных микобактерий для осуществления дифференциально–диагностических исследований.

10. Разработать комплексный аллерген для аллергической диагностики паратуберкулёза крупного рогатого скота и методик оценки его активности и специфичности.

11. Разработать биологическую модель воспроизведения ГЗТ на морских свинках, усилением сенсibiliзирующих свойств микобактерий, для дифференциации *M. avium subsp. paratuberculosis* от других микобактерий.

#### 1.4. Научная новизна

Определены оптимальные варианты сенсibiliзации морских свинок микобактериями различных видов.

Изучены оптимальные дозировки микобактериальных аллергенов, использование которых позволяет получать достоверные результаты оценки иммунобиологических параметров.

Установлено, что точность оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов, на сенсibiliзированных микобактериями морских свинок выше, в сравнении с инфицированным *M. bovis* крупным рогатым скотом.

Определена оптимальная диагностическая доза ППД туберкулина для млекопитающих, в международных единицах *PPD- bovine*, при постановке биологической пробы на лабораторных животных.



Разработана биологическая модель воспроизведения ГЗТ на различные микобактерии на сенсibilизированных морских свинках, путем усиления сенсibilизирующих свойств.

Впервые разработаны инструментальный способ оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов и программное обеспечение статистического расчета этих параметров.

Впервые изучена стабильность иммунобиологических параметров альтотуберкулина Коха, туберкулина свободного от альбумоз, туберкулина на синтетической питательной среде концентрированным нагреванием, после периода длительного хранения, используемых ранее при диагностике туберкулеза животных.

Разработаны комплексные аллергены КАМ-2 и КАМ-3 применимые при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота, для дифференциации неспецифических реакций.

Разработан комплексный аллерген «Параавиум» для аллергической диагностики паратуберкулёзной инфекции крупного рогатого скота.

Приоритетность научно-технических решений подтверждена патентами РФ: №110994, 05.05. 2011, «Шприц для введения животным суспензий лекарственных препаратов и антигенных субстанций»; №116472, 10. 01. 2012, «Пробка для закупорки стеклянных контейнеров, используемых в микробиологии»; №2517218, 25.10.2012, «Способ моделирования гиперчувствительности замедленного типа у морских свинок на микобактерии *M. bovis*»; Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2014611927, 26.12.2013, *Specificity 1.0*; Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2013617658, 20.05.2013, *Bioactive 1.0*; №140669, 09. 01.2014, «Устройство определения морфологических количественных параметров воспалительного процесса, протекающего в коже лабораторных животных»; №2657837, 29. 09. 2017, «Способ выявления анергичного, больного туберкулезом крупного рогатого скота». Разработка награждена Золотой медалью Российской агропромышленной выставки «Золотая осень 2018»; №2691398, 07 08 2018, «Способ оценки

сенсibiliзирующих свойств микобактерий и микобактериальных антигенов»; № 2715220, 13.11.2019, «Способ оценки сенсibiliзирующих свойств атипичных микобактерий»; №2771778, 20. 07. 2021, «Комплексный аллерген для диагностики паратуберкулёза». Разработка награждена Золотой медалью Российской агропромышленной выставки «Золотая осень 2022»; № 2800320, 20. 06. 2022, «Способ дифференциации *M. avium subsp. paratuberculosis* от других видов микобактерий на сенсibiliзированных этими видами микобактерий морских свинках».

### 1.5. Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты, полученные при выполнении исследований, использованы при разработке следующих методических документов:

- Профилактические, диагностические, ограничительные и иные мероприятия, установление и отмена карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов туберкулёза животных. - ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва.-2019.-29с.

- Профилактические, диагностические, лечебные, ограничительные и иные мероприятия, установление и отмена карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию паратуберкулёза животных.- ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва.-2019.-26с.

- Применение симультанной пробы с ППД - туберкулином для млекопитающих и КАМ для индивидуального учета аллергических реакций, отбора реагирующих животных для диагностического убоя. - ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва.-2020.-29с.

-Туберкулины очищенные (ППД) для животных. Межгосударственный стандарт. ГОСТ 32306-2013. Москва Стандартиформ 2013. 32с.

Результаты исследований отражены в следующих монографиях:

-Аллергены и аллергическая диагностика микобактериальных инфекций животных/ А.Х. Найманов, Ю.М. Мясоедов. Курск, 2020.- 238с.- ISBN: 978-5-907/67-74-2, г.

- Хронические инфекции животных Туберкулёз/ А.Х. Найманов, Е.П. Вангели, Ю.М. Мясоедов [и др.]. -Москва: Спутник+,2022.- 320с. -ISBN 978-5-9973-6280-5.

-Хронические инфекции животных. Паратуберкулез/ А.Х. Найманов, Е.П. Вангели, Ю.М. Мясоедов [и др.]. -Москва: Спутник+,2022.- 126 с.- ISBN 978-5-9973-6279-9.

## 1.6. Методология и методы исследований

Для достижения поставленной цели и обоснования применения полученных результатов исследований, были применены адекватные методологические приемы и доступные методы исследования.

Исследования по диагностике туберкулеза осуществляли в соответствии нормативного документа: «Наставление по диагностике туберкулёза животных» от 2002 года. Исследования по диагностике паратуберкулеза, проводили в соответствии нормативного документа: «Наставление по диагностике паратуберкулеза (паратуберкулезного энтерита) животных» от 2001 года.

Исследования проводились с использованием клинических, бактериологических, биотехнологических, иммунологических и математических методов.

При осуществлении экспериментальных работ использовали: морских свинок и крупный рогатый скот.

### 1.7. Положения, выносимые на защиту

-принципы эквивалентности, при подборе дозировок микобактериальных аллергенов, а также вариантов сенсibilизации морских свинок для оценки иммунобиологических параметров.

-практические подходы в совершенствовании методик оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов, в соответствии Международных требований.

-изготовление комплексного аллергена из нетуберкулёзных микобактерий, для дифференциации неспецифических реакций в аллергической пробе при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота.

-изготовление комплексного аллергена из *M. avium* и *M. avium subsp. paratuberculosis*, для аллергической диагностики паратуберкулеза животных.

-разработка биологической модели воспроизведения ГЗТ на морских свинках, усилением сенсibilизирующей способности микобактерий различных видов для дифференциации *M. avium subsp. paratuberculosis* от других видов микобактерий.

### 1.8. Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов исследований подтверждена соответствием теоретических данных результатам проведенных экспериментальных исследований. При анализе и статистической обработке результатов исследований и построении технологических и аппаратных схем, использовали программу «Microsoft Office, 2010». Для выявления статистически значимых различий использовали критерии Стьюдента-Фишера. Материалы диссертации доложены на заседаниях Ученого совета ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН им. Я.Р. Коваленко;

Материалах Международной научно- практической конференции «Актуальные проблемы повышения эффективности агропромышленного комплекса» - Курск 23-25 января 2008 г.; Материалах Международной научно- практической конференции «Научное обеспечение агропромышленного производства». Курск, 20- 22 января 2010 г.; Международной научно- практической конференции «Наука и инновации в сельском хозяйстве» -г. Курск, 26- 28 января 2011г.; Материалах Международной научно- практической конференции: «Научное обеспечение агропромышленного производства» Курск, 25- 27 января 2012г.; Материалах Международной научно- практической конференции «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК» Щелково, 5-7 декабря 2012г.; Материалах Международной научно- практической конференции «Актуальные проблемы агропромышленного производства» -г. Курск, 23-25 января 2013г.; Материалах международной научно-практической конференции «научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК», посвященной 50-летию ФГБНУ «Всероссийский научно- исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Щелково, 25-27 сентября 2019 г.; Материалах Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Ивана Васильевича Звягина. - Щелково, 25-27 сентября 2020 г.; Материалах Международной конференции «Актуальные проблемы лечения и профилактики болезней молодняка» -Витебск 2-4 ноября 2022 г.

### 1.9. Публикации материалов исследований

По теме и материалам диссертации опубликовано более 60 печатных работ, из них 30-в научных рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК МОН РФ, получено 11 патентов на изобретение, в том числе 2 свидетельства о государственной регистрации программы для ЭВМ, изданы 3 методические рекомендации, 3 монографии.

### 1.10. Личный вклад автора в проведённые исследования

Автором непосредственно сформулирован план проведения диссертационного исследования. Основной объём исследования выполнен самостоятельно. Автор принимал непосредственное участие в оценке иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов, в лабораторных условиях, непосредственно разработал техническое приспособление оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов, непосредственно сформулировал алгоритм программного обеспечения оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов.

Участвовал в разработке новых аллергенов КАМ-2 и КАМ-3, предназначенных для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота.

Принимал непосредственное участие в разработке нового аллергена «Параавиум» для аллергической диагностики паратуберкулеза крупного рогатого скота.

Принимал непосредственное участие при разработке биологической модели воспроизведения ГЗТ на морских свинках, позволяющей дифференцировать *M. avium subs. paratuberculosis* от других видов НТМБ.

Автор самостоятельно проанализировал отечественную и зарубежную литературу по теме диссертационной работы, провел статистический анализ данных, сформулировал результаты и выводы, лично написал рукопись настоящей работы.

### 1.11. Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 277 страницах машинописного текста, содержит 45 таблиц, 10 иллюстраций и состоит из следующих разделов: оглавление, введение, обзор литературы, собственные исследования, результаты исследований, обсуждение полученных результатов исследований, заключение, выводы, практическое использование результатов исследований, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список использованной литературы, приложения. Библиографический указатель включает 411 источников до 2022 года включительно, из них 239 отечественных и 172- зарубежных авторов.

## 2.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1. Микобактериальные аллергены: история открытия и совершенствования аллергенов

В 1890 году, на десятом Международном медицинском конгрессе в Берлине, Роберт Кох представил лекарство от туберкулеза (позднее получивший название - туберкулин) [306, 410]. Но, вскоре согласно многочисленным клиническим наблюдениям, выяснилось, что на фоне лечения туберкулином туберкулёза, возросла частота случаев летального исхода [254].

В мае 1891 года, в Прусском парламенте, Р. Кох раскрыл технологию приготовления туберкулина, которая включала: культивирование микобактерий *M. bovis* и *M. tuberculosis* на мясопептонном бульоне, в течение 6-8 недель, с последующим добавлением в КЖ глицерина. После чего посеы микобактерий инактивировали водяным паром, в течение 60 минут, и проводили отделение микобактерий от культуральной жидкости. Далее, при температуре 90° С культуральный фильтрат выпаривали до 1/10 первоначального объема и фасовали во флаконы. Всего Р. Кохом было предложено 7 различных технологий получения туберкулина [49, 66].

В 1907 году Клеменс фон Пирке, исследуя биологические свойства туберкулина, выяснил, что препарат целесообразно использовать не как терапевтическое средство, а как диагностическое средство - для осуществления диагностики туберкулеза у человека [267]. Аналогичные результаты были получены и другими исследователями, что в свою очередь явилось основанием для промышленного производства нового диагностического препарата. В Германии (во Франкфурте) фирма *Meister Lucius & Brüning AG* (позднее переименована -*Hoechst AG*) для нужд медицины стала производить препарат в промышленных объемах. Для ветеринарных целей в Марбурге в период 1914-



1920 годах фирма «*Beringwerke*» производила туберкулин под коммерческим названием *Perlsucht – Tuberculin* [137]. В настоящее время, во Франкфурте-на-Майне располагается институт имени Пауля Эрлиха, в компетенцию которого входит контроль туберкулинов, производимых в Германии [165, 166].

В России, независимо от Роберта Коха, туберкулин был изготовлен в 1888 году Х. И. Гельманом. Эта методика приготовления туберкулина, предполагала выращивание микобактерий на картофельной среде, с последующим приготовлением водного экстракта из микобактериальной биомассы [26].

В 1890 г русский ученый В. Г. Гутман, на инфицированном микобактериями туберкулёза крупном рогатом скоте, провел сравнительные исследования диагностических свойств образцов туберкулина полученных по технологии Коха и Гельмана и отметил равнозначность их биологических свойств [37].

В 1891 г. на базе института экспериментальной медицины начато производство АТК, а для ветеринарного применения только в 1896 г. С началом первой мировой войны производство туберкулина было приостановлено, а возобновлено в ГИЭВе в 1922 года [128, 130, 132].

Аллерген для ветеринарных целей, первоначально изготавливали с использованием микобактерий бычьего вида (двух штаммов) и микобактерий человеческого вида (один штамм). Культуры микобактерий бычьего и человеческого видов культивировали на мясопептонном глицериновом бульоне, в течение 60 суток. После этого проводили инактивацию микобактерий при 1,5 атм., в течение 40 минут. Далее проводили выпаривание КЖ, при температуре 80° С до 1/10 от первоначального объема, с последующим удалением бактериальной массы. Данная технология изготовления АТК с небольшими модификациями сохранилась до внедрения в производство очищенных аллергенов [130, 267, 299].

По мере увеличения поголовья животных в России, возникла необходимость увеличения производства Альттуберкулина, в связи, с чем туберкулин для животных стали производить на Курской биофабрике в период с 1931 года, и по настоящее время [66, 132].

Вместе с тем, повсеместное использование АТК, продемонстрировало его недостаточную специфичность [19, 20, 25]. Так внутрикожное введение здоровым животным аллергена, в ряде случаев, сопровождалось развитием не специфической воспалительной реакции, которая воспринималась как положительная проба на туберкулёз [50, 69]. При этом лабораторные исследования не выявляли микобактерий туберкулёза. Масштабные исследования по определению причин проявления неспецифических реакций продемонстрировали, что основной причиной являются балластные вещества. В этот исторический период становится очевидным взаимосвязь между белковыми составляющими туберкулинов и величиной его биологической активности и специфичности [348, 349, 350]. Таким образом, появилось обоснование, что активность, а также специфичность препарата может быть повышена посредством получения и использования препарата более высокой степени очистки [74, 76, 230, 403].

Известно, что туберкулиновые алергодиагностикумы включают метаболические продукты микобактерий, а также составные компоненты клеточной стенки. В то же время наилучшей диагностической эффективностью характеризуются туберкулины, состоящие преимущественно из видоспецифичных антигенов [73, 77, 78, 298].

Первым шагом в увеличении специфичности туберкулина была разработка синтетических питательных сред, не содержащих чужеродных белков и их производных. Также были разработаны методы адаптации микобактерий туберкулёза к синтетическим питательным средам. Культивирование микобактерий на средах, не содержащих белки, позволило значительно повысить специфичность аллергена [3, 75, 198]. Диагностический препарат, приготовленный в соответствии прописи предложенной немецким ученым-Кохом, но с заменой питательной среды для культивирования микобактерий, содержащие балластные соединения на варианты, состав которых представлен синтетическими соединениями был классифицирован как: туберкулин, свободный от альбумоз - *TAF*, позднее препарат был переименован и обозначался как

туберкулин на синтетической среде, концентрированный нагреванием - *HCSM*. Указанная диагностическая форма в РФ в промышленных масштабах не изготавливалась [227]. Тем не менее, указанная диагностическая форма изготавливается в настоящее время в некоторых странах, и имеет соответствующий Международный стандарт [165].

Следующим шагом в получении очищенного туберкулина явилась разработка биохимических методов осаждения микобактериальных белков в изоэлектрической точке. При получении ППД туберкулинов были использованы: вольфрамовая кислота, ТХУ, сернокислый аммоний, этанол [48, 51, 197, 201].

Наиболее используемыми преципитирующими соединениями, для осаждения туберкуло - протеинов являются: ТХУ и сернокислый аммоний, причем чаще всего практикуется осаждение, только ТХУ [59, 72, 206].

Для диагностики туберкулёза у человека был разработан ППД-Л и на его основе для ветеринарных целей был разработан и изготовлен ППД туберкулин [48, 66, 72, 73].

Промышленное производство ППД туберкулина для млекопитающих запущено в 1957 году, на Курской биофабрике. За основу промышленной технологии изготовления ППД туберкулина была использована методика УИЭВ. Промышленный способ получения ППД туберкулина для млекопитающих, принятый в РФ, включал осаждение микобактериальных белков из культуральной жидкости посредством ТХУ, а повторное осаждение осуществлялось сульфатом аммония, с последующим диализом [6, 7, 148, 158].

Лабораторные и производственные сравнительные исследования диагностических свойств ППД туберкулина российского производства и препаратов иностранных государств (Чехословакии, ГДР, Франции, Англии, Швейцарии), продемонстрировали их равнозначность [116, 127, 202]. В этот период, на промышленной основе, изготовили АТК для птиц. Тенденция приготовления очищенных форм микобактериальных аллергенов также была направлена на получение очищенного ППД для птиц. Поэтому уже

адаптированная технология производства ППД для млекопитающих явилась шаблоном при разработке технологии производства ППД для птиц [9, 212].

В настоящее время отработана технология получения очищенных ППД туберкулинов [55, 66, 162].

По мере увеличения поголовья животных во всем мире, при систематических аллергических исследованиях с использованием очищенных туберкулинов, стали регистрироваться случаи положительной аллергической реакции на ППД для млекопитающих. Таким образом, эффективность скринингового аллергического исследования животных на туберкулез стала снижаться. Последующие исследования, осуществленные в лабораторных условиях, убедительно продемонстрировали, что основной причиной неспецифических реакций на туберкулез является сенсibilизация животных нетуберкулезными микобактериями (НТМБ) [10, 11, 16, 207].

Поиски возможных путей решения указанной проблемы позволили разработать сравнительный аллергический тест, в основе которого был заложен сравнительный анализ результатов аллергического исследования животных, с использованием гетерогенных туберкулинов - ППД для млекопитающих, а также ППД для птиц [274, 275, 323].

Многочисленными работами ученых разных стран выявлено, что для проведения дифференциальной диагностики микобактериальных инфекций использование ППД туберкулина для птиц, более эффективно, в случае сенсibilизации животных микобактериями группы *avium - intracellulareae*. При сенсibilизации животных нетуберкулезными микобактериями других групп, применение ППД для птиц менее эффективно [5, 15, 36].

Исследованиями иммунобиологических свойств нетуберкулезных микобактерий, депонирование эпизоотических штаммов микобактерий; изучение частоты выделения не туберкулезных микобактерий разработка классификации не туберкулезных микобактерий; усовершенствование технологии производства микобактериальных аллергенов, послужили основанием создания специального аллергена из атипичных микобактерий [211, 227, 228]. Производственные

испытания туберкулинов из атипичных микобактерий, для осуществления дифференциальной диагностики продемонстрировали высокую диагностическую эффективность, в сравнении с ППД для птиц [120, 228]. При этом лучшими диагностическими свойствами характеризовались комплексные аллергены, содержащие аллергены из нескольких видов атипичных микобактерий, выделенных от реагирующих животных на территории РФ [114, 227, 228].

С 1979 г. на Курской биофабрике начато промышленное производство КАМа. Комплексный аллерген представляет собой смесь белковых соединений нефотохромогенных и фотохромогенных нетуберкулезных микобактерий второй и третьей групп (в соответствии общепринятой классификации Раньена), полученные из культуральных фильтратов и выделенные осаждением белковых производных ТХУ и переосаждением сульфатом аммония, смешиванием, фасовкой и сублимационной сушкой [209].

Изучение, за более чем вековой период, эпизоотологической ситуации по микобактериальным инфекциям свидетельствует, что в условиях ведения животноводства постоянно происходят изменения вариантов взаимодействия: микобактерии – макро организм. Эти изменения обусловлены изменением вирулентности возбудителей; изменением резистентности животных организмов [2, 23, 65, 391], что обуславливает необходимость усовершенствования существующих комплексных аллергенов и разработку новых [388]. Усовершенствование и разработка новых аллергодиагностикумов может быть реализовано посредством выделения микобактериальных белков с оптимальным соотношением активности и специфичности из микобактериальных клеток и продуктов их жизнедеятельности [390, 393, 408], а также получение из них разных антигенных композиций [241, 245, 288].

Наблюдениями специалистами осуществляющими конструирование микобактериальных туберкулинов было замечено, что наряду с низкой чувствительностью и специфичностью ионинов и ППД для птиц, используемых для аллергической диагностики, назрела практическая необходимость в усовершенствовании аллергена для диагностики паратуберкулёза животных.

Так, за последние 20 лет были разработаны и всесторонне изучены, в различных хозяйствах, с разной эпизоотической ситуацией новые виды аллергенов, изготовленные с использованием нетуберкулёзных микобактерий, или таксонов близких к микобактериям [39, 54, 83].

При этом в отношении новых аллергенов в соответствии Международных требований должны быть разработаны и соответствующие методики контроля качества [32, 33, 411].

Сопоставительный анализ исследований специалистов показывает, что увеличение диагностической эффективности аллергической диагностики возможно при использовании различных методических подходов, что предполагает актуальность исследований в этом направлении.

Производство микобактериальных аллергенов и совершенствование технологий производства связано с изменением состава вариантов аллергенов [84, 398, 399]. Вместе с тем одним из важных критериев в отношении микобактериальных аллергенов является стабильность их иммунобиологических свойств [157, 374, 409].

В настоящее время стабильность лекарственных средств является важной составляющей производственных программ мониторинга [34, 402]. Ранее стабильность оценивалась только для определения срока годности аллергенов.

## 2.2. Иммунные механизмы при микобактериальных инфекциях животных

Одним из первых исследователей иммунных механизмов при туберкулезе был Р. Кох, который на морских свинках продемонстрировал, что подкожное введение патогенных микобактерий вызывает местную воспалительную реакцию, с последующей генерализацией процесса. При этом если инфицированным микобактериями туберкулеза морским свинкам повторно ввести микобактерии туберкулёза, в месте инъекции, через несколько часов, развивается воспаление,

сменяющееся язвой, которая в последующим рубцуется. В научной литературе это явление получило обозначение как феномена Коха [319, 345].

Исследования специалистов демонстрируют, что инфицирование животных патогенными микобактериями сопровождается активацией, как врожденных, так и адаптивных иммунных механизмов [14, 85, 86].

Врожденные иммунные механизмы обеспечиваются макрофагами, дендритными, нейтрофильными, альвеолярными и киллерными клетками [17, 64, 292].

Проникновение микобактерий в животный организм происходит через ворота инфекции: лёгкие (преимущественный путь); кишечный тракт, повреждения кожи, слизистые оболочки (влагалище), также возможен плацентарный путь инфицирования [318, 338, 341].

При респираторном пути заражения, после вдоха воздуха, содержащего аэрозоль микобактерий, последние оседают в бронхиолах и альвеолах животного, и поглощаются фагоцитами (альвеолярными макрофагами) [210, 250, 342].

Ключевым механизмом в противотуберкулёзной защите, равнозначно и последующем исходе туберкулёзной инфекции, является фагоцитоз. Так, известно, что заражение млекопитающих патогенными микобактериями только в ряде случаев сопряжено с формированием туберкулёзного процесса и на этапе фагоцитирования микобактерии могут быть полностью уничтожены [13, 270, 281].

Приведенные доводы являются обоснованием изучения фагоцитоза, например, с применением латекса.

Основные этапы фагоцитирования: миграция макрофага к патогену; адгезия патогена на поверхности макрофага; обволакивание патогена макрофагом с формированием фагосомы, а после фаголизосомы; лизис (полный, неполный) патогена [24, 40, 260].

После фагоцитирования микобактерий альвеолярными макрофагами происходит миграция макрофаг – микобактерии к средостенным лимфатическим узлам [272, 354, 377], после этого Т-клетки активируются, происходит

пролиферация, дифференцирование и передвижение эффекторных  $CD4 + T$ -клеток к легким [269, 289, 291, 352]. При этом известно, что  $CD4$  T-клетки способствуют ингибированию внутриклеточного роста микобактерий, тогда как макрофаги, инфицированные *M. bovis*,  $CD8$  T-клетки лизируют [283, 296, 305].

Анализируя данные литературы по изучению иммунных механизмов при туберкулёзной инфекции, видно большое количество теоретических и практических исследований, что определяет предпочтительность данных направлений. Так, очевидно, что фагоцитоз является начальным и ключевым механизмом иммунной системы определяющий исход микобактериальных инфекций, изучение которого является важной задачей фундаментальной иммунологии [190, 252, 273].

Проникновение в животный организм микобактерий сопряжено с развитием повышенной (гипер-) чувствительности замедленного типа, выявляемой при введении антигенов микобактерий (туберкулина), на чем основана аллергическая диагностика микобактериальных инфекций животных и человека [21, 52, 53, 208].

Закономерности формирования и проявления аллергической реактивности при туберкулёзной инфекции животных, принципиально отличаются от закономерностей аллергической реактивности при микобактериозах [35, 175, 176, 184] и паратуберкулёзе [112, 129, 187].

Так, при сенсibilизации крупного рогатого скота атипичными микобактериями аллергические реакции на ППД для млекопитающих, при повторных исследованиях, выпадают через 2-6 месяцев, что зависит от степени сенсibilизации, физиологического состояния организма животных, а также других причин [186, 189, 193, 195].

Процесс, развивающийся при заражении крупного рогатого скота патогенными микобактериями, характеризуется постоянством туберкулиновой реакции и её интенсивность от момента инфицирования (около 30 суток) и до периода формирования декомпенсации различных систем организма увеличивается или сохраняется на определённом уровне [170, 179, 282]. Причем повышение интенсивности туберкулиновой реакции, при последующих



исследованиях классифицируется как вираж туберкулиновой реакции и является прогностическим критерием развития туберкулёза [192, 218, 231].

При паратуберкулёзе время наступления аллергии, совпадает с периодом первоначального развития процесса. В латентной стадии болезни у большинства животных состояние повышенной чувствительности выявляется через 3-5 месяцев, но не позднее чем, через год после инфицирования [200, 232].

Изучение аллергии при паратуберкулёзе продемонстрировало следующее: 1. аллергия выражена слабее, чем при туберкулёзе и соответствует интенсивности развивающегося процесса; 2. аллергия проявляется нерегулярно, так как периоды активного развития хронического процесса (продолжительность 1-3 года), сменяются его затуханием [130, 169].

При этом экспериментально показано, что туберкулиновая реакция позволяет судить об инфицированности организма, но не позволяет характеризовать степень поражения организма и длительность заболевания [133, 258, 268].

В литературе описаны факторы, влияющие на механизм развития кожной туберкулиновой реакции. Так чувствительность к туберкулину понижается в период хронизации туберкулёзной инфекции, и сопровождается снижением клеточных реакций и формированием антителообразования [239].

Ложноотрицательные результаты туберкулиновой пробы, у инфицированных патогенными микобактериями животных, могут встречаться в начале прогрессирования инфекционного процесса, а также у старых животных [168, 253, 320].

Под действием фармацевтических препаратов, например, преднизолона или имурана интенсивность ГЗТ может быть ослаблена (супрессивный эффект на Т-клетки), даже в условиях прогрессирования туберкулёзного процесса [307, 339].

Указанное обстоятельство имеет важное значение, так как при аллергических исследованиях на микобактериальные инфекции у животных в случае одновременного терапевтического действия лекарственных средств и туберкулина диагностические ошибки, наиболее вероятны.

По мнению ряда иммунологов, повышенная чувствительность замедленного типа является основным звеном противотуберкулёзной защиты [271, 325, 326].

Развитие реакции ГЗТ происходит в две стадии. Первая стадия связана с сенсibilизацией организма микобактериальными антигенами, вторая стадия опосредована введением антигена (в данном случае туберкулина) в организм. Длительность первой стадии в среднем составляет около 30 суток. На данной стадии активируются *Th1 CD4<sup>+</sup>* клетки, после взаимодействия с антиген - презентирующими клетками [386]. *Th1* клетки начинают секретировать *IL-12*, который активирует макрофаги [313, 327, 331]. На указанной стадии *IL-12* стимулирует образование *Th1* и подавляет образование *Th2*, которые регулируют В- клеточный ответ, в результате происходит накопление *Th1* клеток, которые выполняют ключевую функцию [329, 366, 383].

Так показано, что при туберкулёзной инфекции состояние ГЗТ можно перенести от одного животного другому в пределах вида, посредством Т-лимфоцитов [231, 265, 381].

Второй этап реакции развивается после повторного введения антигенов микобактерий (ППД - туберкулина) животному. В организме антигены микобактерий подвергаются фагоцитированию макрофагами. Образовавшиеся после первичного введения *Th1*, в ответ на представление макрофагами вводимого антигена, хелперные клетки секретируют различные цитокины, в том числе МИФ и МХФ в кровяное русло, что ведет к активации макрофагов и их активной миграции в место введения антигена [385, 404, 405].

К месту воспаления  $\gamma / \delta$  Т-клетки привлекают другие *Th1*-лимфоциты и макрофаги [384]. *Th1*-клетки секретируют цитокины. ИНФ- $\gamma$  активирует макрофаги, которые усиливают продукцию воспалительных медиаторов [397, 407], *TNF- $\beta$*  способствует развитию локального тканевого повреждения и повышению на кровеносных сосудах экспрессии адгезивных молекул [264, 297, 330]. *IL-3* и ГМ-КСФ являясь факторами гемопоэтической дифференцировки, регулируют созревание из предшественников костного мозга моноцитов. Зрелые моноциты мигрируют в зону воспаления, заменяя разрушенные макрофаги.

Разрушение макрофагальных клеток сопровождается появлением пирогенных соединений [353, 358, 359].

*IL-2* стимулирует продуцирование хемокинов *CXCL8*, *CCL5* и *XCL1*, которые привлекают и активируют Т-клетки [369, 379]. Макрофаги продуцируют различные хемокины, а также серотонин, что в свою очередь сопровождается привлечением клеток крови - базофилов. Исследованиями продемонстрировано, что у грызунов серотонин, а у человека гистамин секретируемый базофилами, в очаге поражения усиливает миграцию мононуклеарных клеток. Хемокины *CCL2* и *CCL3*, продуцируемые Т-клетками, индуцируют дегрануляцию тучных клеток, а некоторые *CD4* + Т-клетки активируют тучные клетки непосредственно через антиген МНС класса II [380].

Хемокины Т-клеток, усиливают привлечение Т-клеток в воспалительную зону. При этом подавляющая часть Т-клеток специфически не сенсibilизированы к туберкулину [257, 325, 370, 372]. Предположительно только 5% лимфоцитов специфичны в отношении туберкулина, участвующие в реакции гиперчувствительности [231, 360].

Небольшое количество антиген-специфических Т-лимфоцитов (1-5% от обычного типа клеток, вовлеченных в воспалительную реакцию) запускают реакцию ГЗТ, основными эффекторами которых являются макрофаги [239, 362, 365].

В воспалительной зоне макрофаги, привлекаемые цитокинами *CXCL8* и *IFN-γ* активируются. Интенсивная реакция гиперчувствительности замедленного типа связана с высвобождением протеаз и оксидантов из активированных макрофагов, и как следствие повреждением тканей. Макрофаги поглощают туберкулин и разрушают его. Нарушенный баланс посредством регуляторных клеток позволяет запустить репарационные процессы и восстановить физиологическую функциональность тканей [239, 261, 293].

Перечисленные механизмы направлены на локализацию микобактериальных антигенов в макроорганизме, что морфологически сопровождается развитием классической туберкулиновой реакции [231, 375].

Клеточный состав кожной реакции воспаления представлен эпителиоидными и гигантскими клетками, макрофагами, лимфоцитами, моноцитами [333, 356].

При этом, одним из важных критериев кожной туберкулиновой реакции, является длительность сохранения состояния ГЗТ, а также максимальная выраженность реакции, после предшествующего введения туберкулина [244, 371, 373].

Так лабораторный контроль микобактериальных аллергенов проводится при моделировании туберкулёзной инфекции на морских свинках, с формированием ГЗТ [27, 28, 30]. Вместе с тем определено, что у крупного рогатого скота максимальная интенсивность внутрикожной аллергической реакции регистрируется через 72 часа, после введения аллергена, а у мелкого рогатого скота через 48 часов. В тоже время в отношении морских свинок, в соответствии литературных источников, время учета реакции является противоречивым [132, 136, 364]. Так в отношении одних литературных источников учет реакции ГЗТ должен осуществляться через 24 часа [30, 31], а согласно других период может составлять 48 часов [113]. Подобные различия могут быть причиной погрешностей, что в свою очередь обуславливает проведение исследований по определению оптимального времени оценки ГЗТ.

Также в отношении морских свинок указано, что тесты ГЗТ могут быть осуществлены один раз, после сенсibilизации, в других источниках допускается несколько тестов в период до 6 месяцев.

Вместе с тем учитывая себестоимость сенсibilизированных животных необходимо исследование по оценке оптимального периода использования сенсibilизированных морских свинок для проведения тестов ГЗТ.

### 2.3. Развитие методов контроля микобактериальных аллергенов

Период от момента изобретения туберкулина и до настоящего времени характеризовался изменением технологии производства: от микобактериальных туберкулинов, в состав которых входили неспецифические компоненты, до микобактериальных туберкулинов имеющие в составе преимущественно высокоочищенные белковые производные [95, 216, 355]. При этом промышленное производство микобактериальных аллергенов характеризуется разработкой лабораторных методов оценки, как качественных, так и количественных характеристик [62, 63, 80].

В свою очередь методические подходы контроля качества иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов, претерпели значительные изменения, что сопряжено с усовершенствованием технологии производства и выработкой, унифицированной международной нормативной базы.

Способы оценки качественных и количественных параметров туберкулиновых аллергенов ветеринарного назначения, можно распределить следующим образом:

1. Способы исследования параметров туберкулинов, характеризующие диагностическую значимость исследования, с использованием микобактериальных аллергенов. К указанным параметрам относятся: определение активности, сенсibiliзирующих свойств, реактогенности и специфичности.

2. Способы исследования критериев туберкулинов местного и системного влияния на животный организм. К указанным параметрам относятся: определение специфической безвредности, а также токсического действия.

**Активность.** Данный метод характеризует биологический эквивалент единиц Международного стандарта, в номинальном объеме туберкулина ( $\text{см}^3$ ). Метод первоначально был разработан в отношении крупного рогатого скота, инфицированного патогенными микобактериями [27]. Накопление

экспериментальных и производственных данных, относительно туберкулина, позволили методически оценивать активность дублированием как на инфицированных сельскохозяйственных животных (крупном рогатом скоте), так и на лабораторных животных (сенсibilизированных морских свинках) [97, 138].

Для альттуберкулина описан метод определения степени активности, проводимый на инфицированном патогенными микобактериями крупном рогатом скоте [27]. В основе указанного способа была использована методика Коха [216, 254, 284]. При этом осуществлялось введение кратных разведений туберкулина, и таким образом оценивалась диагностическая эффективность, с учетом получения серий препарата, с неодинаковым содержанием биологически активных и специфических микобактериальных белков [27].

Основное направление совершенствования способа оценки активности туберкулина, на лабораторных животных (морских свинках), было реализовано использованием нескольких дозировок тестируемой серии препарата, в сравнении с аналогичными известными дозировками контрольной серии.

Принимая во внимание современные требования нормативной документации, биологическая активность туберкулиновых аллергенов оценивается в отношении всех производственных серий, на сенсibilизированных микобактериями (из которых изготовлен препарат) морских свинках [34, 93, 96].

Вместе с тем, в англоязычной литературе в отношении ППД туберкулина, изготовленного с использованием микобактерий *M. bovis* указывается на целесообразность двойного последовательного тестирования, с использованием сенсibilизированных морских свинок и инфицированного крупного рогатого скота [61, 322].

Для оценки биологической активности альттуберкулина для птиц был разработан метод, с использованием инфицированных кур. Указанный метод являлся качественным. Методически оценка осуществлялась производственной серии, относительно контрольной, с применением одной диагностической дозы. Развитие воспалительной реакции на производственную серию, эквивалентной

контрольной серии характеризовала приемлемую в диагностическом плане активность [28].

Совокупность экспериментальных и производственных данных, полученные при исследовании активности туберкулина для млекопитающих позволили провести усовершенствование метода оценки активности туберкулина для птиц. Так нормативной документацией резюмирующие эти исследования, предусмотрено двойное последовательное тестирование, с использованием сенсibilизированных морских свинок и зараженных патогенными микобактериями птичьего вида, кур [29].

Дальнейшее развитие метода контроля активности ППД для птиц сопровождалось аналогично ППД для млекопитающих, разработкой метода предусматривающего парное использование различных доз производственной серии, относительно контрольной [203, 205, 206].

В соответствии нормативных документов, по контролю туберкулинов, оценка биологического эквивалента ППД для птиц производится на сенсibilизированных микобактериями птичьего вида, морских свинок [34, 62, 63].

Уникальной разработкой отечественных ветеринарных специалистов является комплексный микобактериальный аллерген, созданный при использовании нетуберкулезных представителей микобактерий. Аналогично классических туберкулинов, при промышленном производстве, возникла практическая необходимость оценки биологического эквивалента. Многочисленные исследования научных школ ВГНКИ и ВИЭВ убедительно продемонстрировали целесообразность оценки биологического эквивалента КАМ на морских свинках сенсibilизированных нетуберкулёзными сапрофитами, в равной сенсibilизирующей дозе, с учетом потенцирования сенсibilизирующего эффекта. При этом, в соответствии этапа развития знаний о микобактериальных аллергенах, активность оценивалась пропорцией: суммарная реакционность контрольной серии, к суммарной реакционности тестируемой серии [7].

На современном этапе развития знаний относительно микобактериальных аллергенов, добавлены новые значимые критерии, а именно использование в расчетах сенсibilизированных лабораторных животных с реакционностью доз, от 25 до 8 мм. При этом количество доз тестируемого аллергена и контрольного аллергена соответствует трём [205]. Кроме того, другим значимым критерием, является использование схемы последовательного инъецирования разведений производственной и контрольной серии аллерген, а по правилу полного либо не полного латинского квадрата, и последующего статистического анализа [34, 216, 295].

Промышленное производство микобактериальных аллергенов обеспечило животноводческие предприятия необходимым их количеством. Вместе с тем возникла практическая необходимость оценки биологической активности, так как использование туберкулинов без стандартизированного параметра активность обуславливает не одинаковый диагностический результат. В связи с этим были разработаны соответствующие Международные стандарты активности [160, 300, 400].

Первым был разработан в Лондоне Национальным медицинским институтом Международный стандарт для АТК в 1928 году, с содержанием в 1 мл - 100000 ТЕ. При этом был введен термин - Туберкулиновая единица.

Туберкулиновая единица определяется как минимальное количество препарата, которое, не вызывая сильной реакции, выявляет 80–90 % инфицированных возбудителем туберкулеза лиц [228]. В.В. Коломиец, А.А. Евглевский считали, что ТЕ - это наибольшее разведение туберкулинового аллергена, которое способно вызвать после внутрикожного введения, у сенсibilизированных морских свинок, специфическую аллергическую реакцию в виде папул/эритемы размером 5 -7 мм в диаметре [41, 42].

Второй Международный стандарт для АТК был предложен в Государственном институте сывороток в 1935 году, в Копенгагене. 1 мл препарата соответствовал 10000 ТЕ. Третий Международный стандарт для АТК



был приготовлен в 1965 году в Копенгагене. 1 мл. препарата содержала 90000 ТЕ [216].

В период 30-40 годов 20 века проводились работы по разработке очищенного туберкулина. В результате проведенных исследований Ф. Зейберт и соавторами, посредством осаждения микобактериальных белков серноокислым аммонием, был приготовлен препарата, получивший название *PPD-S* [66, 351, 394].

В нашей стране Ф.И. Осташко (1953) по видоизмененной методике Х. Грина, при диагностировании у крупного рогатого скота туберкулезной инфекции, приготовил ППД - туберкулин. В результате испытания этого препарата на больном туберкулезом крупном рогатом скоте, автор установил значительное диагностическое превосходство его, по сравнению с альттуберкулином [164].

В 1952 г. ВОЗ была утверждена международная единица действия - *PPD-S* туберкулиновая единица (ТЕ), составляющая 0,00002 мг активного вещества. Одна туберкулиновая единица стандартного ППД- туберкулина равна по весу 0,00002 мг. Этот эталон хранился в Копенгагенском институте вакцин и сывороток и в США [61, 321, 396].

В 1968 г. международный комитет экспертов ВОЗ по биологической стандартизации подтвердил, что одна ТЕ ППД - туберкулина должна содержать 0,000028 мг вещества, и все национальные стандарты должны быть приравнены к Международному [61].

От момента освоения в России промышленного производства альттуберкулина и в период до 80 годов прошлого столетия указанный аллерген являлся основным диагностическим инструментом. В 80 годах разработана отечественная технология и начато производство очищенного туберкулина на промышленном уровне.

При этом некоторые особенности промышленного изготовления альттуберкулина легли в основу технологии очищенного туберкулина, например этап культивирования микобактерий предполагал использование аналогичных

штаммов микобактерий - *M. tuberculosis* (№ 192 и ДТ/СТ) и *M. bovis* (№ 8, № 14, *Vallee*). Штаммы № 8 и № 14 были выделены в 1934 г. в ВИЭВ крупного рогатого скота с патологоанатомической картиной туберкулёза. Штамм *Vallee* был получен из Франции. Штаммы № 192 и ДТ/СТ привезены из США.

После выращивания микобактерий на питательной среде, биомассу микобактерий на синтетической питательной среде инактивировали температурой выше 100 °С, после чего посредством матерчатого фильтра отделяли микобактериальную массу от культуральной жидкости. После этого проводили последовательное осаждение (трихлоруксусной кислотой) / переосаждение (сернокислым аммонием). Последующие производственные этапы включали обессоливание, последовательную фильтрацию, ампульную фасовку и программное сублимирование при различных температурах с финальной запайкой. Использование высушенного туберкулина предполагало его восстановление в прилагаемом растворителе, включающего детергент глицерин, консервант фенол разведенные в физиологическом растворе.

Позже появились сообщения о том, что туберкулины, изготовленные только из одних штаммов *M. bovis*, обладают большей видовой специфичностью и более активны, чем туберкулины, изготовленные из *M. tuberculosis* и *M. bovis* [57, 256, 279, 382]. В дальнейшем индустриально развитые государства перешли к изготовлению очищенного туберкулина для млекопитающих только из микобактерий из *M. bovis*.

В настоящее время многие страны, в том числе и Россия, выпускают очищенные туберкулины в виде готового к употреблению раствора.

В нашей стране с 2012 г. Курская биофабрика производит ППД - туберкулин для млекопитающих из *M. bovis*, штамм AN-5.

Все серии туберкулинов для млекопитающих, стандартизируют по содержанию туберкулиновых единиц на гомологично сенсibilизированных туберкулину *M. bovis* морских свинок. Для контроля используют референс - препараты, стандартизированные по Международным стандартам.

Следует отметить, что методы сенсibilизации различаются между собой. Так иммунизация животных микобактериями внутривенно и внутрибрюшинно приводит к стимуляции клеток супрессоров, а подкожно к формированию клеточного иммунитета [87, 109, 111, 229]. Неодинаковые подходы, реализуемые при сенсibilизации морских свинок (обусловленные статусом микобактерий и использованием адьювантов) предполагают проведение всесторонних исследований.

Аллерген для млекопитающих производимый в РФ охарактеризован в отношении Международного стандарта *PPD- bovine* [161, 167, 400]. Вместе с тем не охарактеризована стандартная доза ППД для млекопитающих для осуществления биопробы, в связи с тем, что она выражена в единицах активности предшествующего стандарта *PPD-S*. Кроме того, с учетом колебания содержания единиц активности в различных коммерческих сериях туберкулина, необходимо определить диагностическую эффективность диапазона доз.

**Специфичность.** В историческом аспекте тест оценки специфичности разработан первоначально в отношении туберкулина для млекопитающих, а потом и в отношении аллергена для птиц, и позднее для комплексного аллергена из атипичных микобактерий. Метод оценки специфичности ППД для млекопитающих предусматривал определение развития неспецифического воспалительного процесса, в месте инъекции здоровым морским свинкам и крупному рогатому скоту [27]. В соответствии нормативной документации, используемой при контроле туберкулина для млекопитающих и туберкулина для птиц в настоящее время, выше приведенный параметр классифицируется как реактогенность и оценивается при использовании здоровых морских свинок [34]. Специфичность аллергена для птиц, в историческом аспекте, оценивалась по способности препарата индуцировать специфический воспалительный процесс у больных туберкулёзом курочек [28].

В отношении аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий метод оценки специфичности был разработан после внедрения в России методов молекулярного фракционирования [8].

Предпосылкой в разработке вариантов теста оценки специфичности микобактериальных аллергенов обусловлено регистрацией неспецифических реакций на туберкулин для млекопитающих, в благополучных по туберкулёзу сельскохозяйственных предприятиях. При детальном исследовании причин проявления неспецифических реакций были изолированы микобактерии различных групп, по классификации Раньена [127, 132, 136].

В соответствии современных требований специфичность туберкулина для млекопитающих оценивается на сенсibilизированных *M. avium* морских свинок, при этом в роли контрольного препарата используется ППД для птиц [34]. Изучение специфичности туберкулина для птиц проводится на лабораторных животных, сенсibilизированных *M. bovis* [5, 94, 98].

Анализируя нормативную документацию, описывающую вопросы оценки активности и специфичности туберкулинов для млекопитающих и птиц, допускается использование, как живых, так и инактивированных микобактерий [19, 51, 61]. Вместе с тем исследованиями показано различие биологических свойств гретых и не гретых культуральных фильтратов микобактерий [340, 406], что в свою очередь подразумевает различие вариантов сенсibilизации морских свинок живыми и термоинактивированными микобактериями, и обуславливает актуальность проведения данного исследования.

Кроме того, в доступной литературе имеются сведения, что используются разные дозы микобактериальных антигенов и дозировки микобактерий для сенсibilизации морских свинок [7, 19, 63]. Подобные подходы могут являться причиной различия результатов иммунобиологических свойств туберкулинов, что в свою очередь обуславливает проведение исследований.

Комплексный аллерген из атипичных микобактерий, как показано исследованиями, позволил усовершенствовать дифференциальную диагностику туберкулёза крупного рогатого скота. При осуществлении аллергического исследования предусматривалось использование одной дозы КАМ и одной дозы туберкулина для млекопитающих. Путем перерасчета дозировок и разработки лабораторной модели на морских свинках тест определения специфичности

обозначен как тест оценки видовой специфичности. Оценка видовой специфичности КАМа на морских свинках подразумевала определение наибольшей выраженности на дозы сравниваемых аллергенов в группе морских свинок, которые сенсibilизированы микобактериями бычьего вида, а также в группе животных сенсibilизированных смесью микобактерий, входящие в состав комплексного аллергена [7, 59].

В настоящее время оценка специфичности микобактериальных аллергенов (туберкулинов для млекопитающих и птиц) осуществляется в процентах, подобный методический подход должен быть реализован и в отношении вариантов комплексных туберкулинов, составленных из различных аллергенов атипичных микобактерий, что в свою очередь предполагает проведение исследований.

**Реактогенность.** Определение реактогенности предполагает выявление у микобактериальных аллергенов способности индуцировать не специфическое воспаление у несенсibilизированных здоровых морских свинок в дозировке  $\frac{1}{4}$  диагностической дозы крупного рогатого скота. Отсутствие в месте внутрикожной инъекции воспалительного процесса или появление покраснения диаметром менее пяти мм. свидетельствует о пригодности аллергена для диагностических целей [31, 34, 204].

**Сенсibilизирующие свойства.** После наращивания промышленного производства альттуберкулина для млекопитающих, повсеместного и многократного его применения выявился недостаток- способность сенсibilизировать здоровых животных, в результате чего здоровые животные были классифицированы как инфицированные. Как выяснилось позднее, указанный недостаток обусловлен использованием питательных сред, содержащие белковые производные не микобактериального происхождения [216].

Условия развития сенсibilизации крупного рогатого скота, обусловленные использованием АТК были экстраполированы на лабораторную модель - морские свинки. Для этого морским свинкам не использованные ранее в исследованиях

многократно внутривенно инъецировали АТК с последующим выявлением развития неспецифического аллергического воспаления [212].

**Токсичность.** Определение токсичности туберкулиновых препаратов предусматривает выявление негативного системного и местного влияния на организм интактных морских свинок [34, 204].

**Специфическая безвредность.** Тест определения специфической безвредности предполагал выявление контаминации готового туберкулина микобактериями, используемые при его изготовлении. Методика позволяет выявлять жизнеспособные микобактерии путем введения препарата в организм интактных морских свинок (исследование туберкулина для млекопитающих) или кроликов (исследование туберкулина для птиц), с последующими, при необходимости, бактериологическими и микробиологическими исследованиями. Аллерген оценивается как специфически безвредный, если в период наблюдения у лабораторных животных не выявляются характерные для туберкулеза патологические изменения; аллергическая проба является отрицательной; при применении комплекса дополнительных исследований не выявляются микобактерии [34, 204].

Сравнительный анализ методов оценки биологических параметров туберкулинов демонстрирует, что ключевыми лабораторными параметрами определяющие диагностическую эффективность аллергической диагностики микобактериальных инфекций животных являются: реактогенность, специфичность и активность.

Учитывая то, что с микобактериальными белками ассоциируется активность, специфичность и реактогенность, при изготовлении ППД туберкулинов, для предотвращения снижения концентрации белков добавляется детергент (Твин-80, глицерин). Для подавления развития микроорганизмов контаминантов добавляется консервант фенол [51, 63, 72].

Данные литературы наглядно демонстрируют, что при оценке иммунобиологических параметров туберкулиновых аллергенов на результат исследования оказывает влияние биологическая система, используемая в тестах и

оператор, осуществляющий постановку теста. Учитывая выше изложенное, целесообразным является: оценка параметров животной биологической системы, оказывающие значимое влияние на результаты тестов, определение эквивалентного соотношения оптимальных дозировок микобактерий различных видов и микобактериальных аллергенов при оценке иммунобиологических параметров. Для снижения погрешностей, связанных с оператором необходимо техническое устройство оценки активности и специфичности туберкулиновых аллергенов, а также специализированное программное обеспечение статистического расчета иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов.

#### 2.4. Аллергическая диагностика микобактериальных инфекций и её совершенствование на современном этапе борьбы с туберкулёзом животных

Туберкулинодиагностика – это совокупность методик позволяющие выявить специфическую сенсibilизацию организма животных (микобактериями) в том числе родственных видов, посредством использования микобактериальных аллергенов, (из микобактерий или близкородственных бактерий) в реакции гиперчувствительности [172, 173, 174, 107].

За период, от создания туберкулина и по настоящее время аллергическая диагностика составляет начальный этап определения микобактериальных инфекций животных [122, 126, 213, 233].

В агропромышленном комплексе РФ используются различные виды продуктивных животных, в связи с этим разработаны оптимальные варианты аллергической диагностики туберкулёза, в отношении каждого вида. В отношении крупного рогатого скота разработано наибольшее количество вариантов аллергической диагностики микобактериальных инфекций. Для крупного рогатого скота были предложены следующие варианты аллергической

диагностики микобактериальных инфекций: подкожный, накожный, глазной, внутрикожный, внутривенный, пальпебральный, вагинальный, назальный и т.д. [113, 119, 131]. Однако сравнительное изучение методов введения туберкулина продемонстрировало, что внутрикожный способ инъекции является наиболее чувствительным и практичным [114, 115, 117].

Внутрикожная туберкулиновая проба была предложена в 1908 г. Муссю и Манту, и в последующие годы получила мировое распространение.

На основании исследований по применению альттуберкулина в 1925 г. Британской комиссией министерства сельского хозяйства Британии была предложена двукратная внутрикожная проба [132].

На 18-м международном ветеринарном конгрессе в 1938 году, было установлено, что основным методом диагностики туберкулёза у животных является аллергопроба. При этом для крупного рогатого скота внутрикожная проба, в сравнении с другими вариантами является наиболее эффективной [136].

В 1947 г. были проведены сравнительные исследования, в результате которых установлено, что однократная туберкулиновая проба, и двукратная туберкулиновая проба по диагностической ценности равнозначны. Поэтому в 1947 г. решением британского министерства сельского хозяйства вместо двукратной туберкулиновой пробы введена однократная проба [132].

Позднее, метод однократной внутрикожной туберкулиновой пробы был принят государствами Западной Европы, Америки и Африки. При осуществлении скрининга животных на туберкулёз однократная туберкулиновая проба продемонстрировала высокую эффективность [277].

В указанный период аллергические исследования на туберкулёз осуществлялись посредством использования внутрикожного варианта туберкулиновой пробы, с использованием туберкулина для млекопитающих, при этом проявление неспецифических реакций нивелировалась методикой проведения теста [196]. Так учёт аллергической реакции после первой инъекции, осуществлялся через 72 часа и спустя 24 часа, после повторного введения. При формировании в месте инъекции туберкулина, воспалительной реакции в виде



отёка и увеличения толщины кожной складки на 5 мм. и более характеризует положительный результат; увеличения кожной складки на в интервале 3 - 4 мм. характеризует сомнительный результат, и отрицательный при развитии воспалительной реакции менее 3 мм. [132, 136].

Также исследованиями было показано, что развитие аллергической реакции, в месте внутрикожного введения аллергена, у здоровых животных снижается или полностью исчезает к 16-20 часам. При этом регистрируются единичные случаи, когда у животных остаточные воспалительные явления сохраняются в период до 72 часов, с формированием воспалительной реакции в виде утолщения кожной складки на 3 мм. [67].

Среди инфекционных заболеваний животных и людей, в настоящее время, туберкулёзная инфекция является широко распространённой. До настоящего времени в отношении туберкулёзной инфекции не разработаны высокоэффективные профилактические и терапевтические средства [303, 308, 309].

В основе комплекса мер профилактики, при туберкулёзе животных, лежит прижизненная диагностика, основанная на использовании внутрикожной аллергической пробы, с ППД туберкулином [182, 183, 191, 196].

Широкое применение внутрикожной аллергической пробы сопровождалось двумя проблемами. Первая проблема опосредована выявлением кожной реакции у не инфицированных животных, как из благополучных, так и неблагополучных животноводческих хозяйств. Вторая проблема опосредована не выявлением инфицированных животных в животноводческих хозяйствах, неблагополучных по туберкулёзной инфекции.

Поэтому диагностика туберкулёзной инфекции должна представлять собой комплекс, включающий как аллергический, так и другие методы [124, 125, 181].

В соответствии опыта мировой практики наиболее используемым методом аллергической диагностики туберкулёза животных является однократная внутрикожная туберкулиновая проба, с определением толщины кожной складки через 3 дня, после введения аллергена [322].

Основным недостатком метода аллергической диагностики туберкулёза является то, что появление реакции свидетельствует только об изменении реактивности животных, из-за влияния различных причин [142, 171, 316].

При этом, в подавляющем числе случаев, причиной проявления реакции на внутрикожное введение туберкулина являются патогенные микобактерии туберкулёза [368, 392, 395]. Менее частой причиной являются нетуберкулёзные микобактерии или бактерии, характеризующиеся высокой степенью антигенной гомологии с микобактериями [79, 146, 310, 315].

Таким образом, реакции на туберкулин могут быть классифицированы как: специфические и неспецифические [68, 71, 93, 110].

Специфическая реакция обусловлена сенсibilизацией животных туберкулёзными микобактериями [43].

На основании большого клинического опыта, накопленного при проведении аллергических исследований в животноводстве, неспецифическая реакционность может быть классифицирована как парааллергическая (причина реакционности обусловлена сенсibilизацией животных нетуберкулёзными микобактериями); псевдоаллергическая (причина реакционности не связана с микобактериями) [82, 60, 127].

Проблема специфичности туберкулиновой пробы обусловлена наличием общих видовых микобактериальных антигенов у микобактерий туберкулёза и нетуберкулёзных микобактерий [81, 77, 114].

Указанная проблема является основанием для проведения исследовательских работ направленных на разработку способов дифференциации аллергической реакции для детекции животных характеризующихся неспецифической реакционностью [43, 60, 136].

Атипичные микобактерии широко распространены в природе и их выделяют в различных климатических зонах РФ. В подавляющем числе случаев выявление животных характеризующиеся неспецифической реактивностью обусловлено сенсibilизацией микобактериями четвертой группы по классификации Раньона [58, 139, 143, 144]. Так в РФ, согласно классификации

Раньона, выявляются следующие группы нетуберкулёзных микобактерий: первая группа - около двух процентов; вторая группа - около двадцати процентов; третья группа - около семнадцати процентов; четвертая группа около шестидесяти процентов [155, 163 127].

От момента формирования проблемы появления неспецифических реакций были обоснованы дифференциальные подходы осуществления аллергического исследования, при этом наиболее массовым способом являлась симультанная проба предполагающая использование двух гетерологичных аллергенов: ППД для млекопитающих и ППД для птиц [253].

Дифференциальная (симультанная) аллергическая проба базируется на видовой специфичности аллергенов микобактериям сенсibiliзирующих организм животных и большей выраженности кожной реакции ГЗТ на гомологичный аллерген [132, 136, 194].

В свою очередь, при проведении симультанного исследования не принимаются во внимание вероятность смешанного инфицирования животных обусловленных патогенными и апатогенными микобактериями, что в ряде случаев значительно затрудняет постановку диагноза и проведение оздоровительных мероприятий в неблагополучных хозяйствах. Известно, что неспецифические реакции, обусловленные атипичными микобактериями, как правило, характеризуются незначительным увеличением толщины кожной складки (на 3-5 мм.) и являются нестабильными, то есть у одних животных выявляются, а затем исчезают, но проявляются у других [123, 127].

Анализ диагностических исследований большого количества благополучных и неблагополучных хозяйств показывает, что систематическое аллергическое исследование, с выбраковкой из стада реагирующих животных не позволяет решить проблему появления новых реагирующих животных с неспецифическими реакциями (особенно при применении двойной внутрикожной пробы и оценке аллергии от трех и более мм.).

Комплексный анализ результатов оценки животноводческих хозяйств по микобактериальным инфекциям продемонстрировал положительную динамику:

увеличения случаев неспецифической реактивности на туберкулин для млекопитающих, на фоне значительного снижения неблагоприятных по туберкулёзу хозяйств [221].

Следует отметить, что в той или иной степени с проблемой неспецифической реактивности при диагностике туберкулёза крупного рогатого скота столкнулись во всех странах мира, особенно на финишном этапе борьбы. Это послужило сдерживающим фактором в использовании аллергической пробы, при проведении диагностических исследований. При этом контроль распространения туберкулёзной инфекцией проводится только при забое, а аллергическое исследование предусмотрено при экспорте скота.

В России, в соответствии нормативных документов, контроль по туберкулёзу крупного рогатого скота проводится посредством туберкулиновой пробы в осенний и весенний периоды. При этом выявляемые реагирующие животные считаются подозреваемыми в инфицировании с последующей верификацией посредством патологоанатомических и бактериологических методик исследования [113].

Для проведения дифференциальной диагностики микобактериальных инфекций, во многих странах мира, была принята симультанная проба, с использованием туберкулина для млекопитающих и туберкулина для птиц [210, 228].

В РФ в соответствии мировой практики, первоначально для осуществления дифференциальной диагностики микобактериальных инфекций использовали туберкулин для млекопитающих и для птиц, что было целесообразно, так как в этот период, в подавляющем числе случаев, сенсibilизацию крупного рогатого скота обуславливали микобактерии туберкулёза птичьего вида. После масштабных мероприятий против туберкулёза птиц в птицеводческих хозяйствах эпизоотическую нишу стали осваивать различные виды НТМБ. Изменение микробиоценоза обусловленного нетуберкулёзными микобактериями характеризовалось изменением антигенного спектра, вызывающего сенсibilизацию крупного рогатого скота и сопровождалось снижением

эффективности симультанной пробы с использованием аллергенов: ППД для млекопитающих и ППД для птиц [234]. Данные наблюдения явились основанием для разработки аллергенов из атипичных микобактерий.

Многочисленными исследованиями, проведенными в ВГНКИ и ВИЭВ продемонстрировано, что аллергическая проба, предполагающая использование КАМ, характеризуется наибольшей диагностической эффективностью, в сравнении с использованием ППД для птиц, в животноводческих хозяйствах, у животных которых изолированы не туберкулёзные микобактерии [114, 120, 123].

Туберкулиновые препараты, в зависимости от вида микобактерий, с использованием которых получен микобактериальный аллерген, могут быть классифицированы, как туберкулин ППД для млекопитающих, в англоязычной литературе обозначаемый как *PPD-B* (изготовлен из *M. bovis*), ППД для птиц, в англоязычной литературе обозначаемый как *PPD-A* – (изготовлен из *M. avium*) [400, 401] и сенситины, представляющие собой аллергены из различных видов нетуберкулёзных микобактерий [136] и родственных видов (родококки, нокардии). В англоязычной литературе приведена следующая классификация сенситинов:

- PPD- I* - препарат изготовлен из микобактерий *M. intercellulare*;
- PPD- F* - препарат изготовлен из микобактерий *M. fortuitum*;
- PPD- G* - препарат изготовлен из микобактерий *M. scrofulaceum*;
- PPD- Y* - препарат изготовлен из микобактерий *M. Kansasii*;
- PPD- Sm* - препарат изготовлен из микобактерий *M. smegmatis*.

При введении аллергена из типичных микобактерий сенсibilизированным туберкулёзными микобактериями животным развивается ответная туберкулиновая реакция [251, 278]. В то же время при введении животным аллергенов из атипичных микобактерий такая реакция не развивается, или интенсивность её ниже, в сравнении с реакцией на туберкулины из туберкулёзных микобактерий [235, 236, 389]. Кроме того, экспериментально доказано, что при введении сенситина из микобактерий сенсibilизировавшего организм животного

развивается ГЗТ, интенсивность, которой, в сравнении с сенситинами из других видов нетуберкулёзных микобактерий, выше [145, 225, 228].

Учитывая то, что в Российских регионах распространены атипичные микобактерии различных групп, комплексный аллерген должен быть, изготовлен с использованием микобактерий предпочтительно изолируемых от крупного рогатого скота, на всей территории страны [127, 132, 136].

Не смотря на большую диагностическую ценность, основным недостатком симультанной пробы, с использованием аллергена ППД для млекопитающих и КАМ, является необходимость тестирования в группе животных (не менее 6 особей) [7]. При этом если количество достоверно выраженных реакций будет менее 6, то результаты симультанной пробы считаются недостоверными и установить причину сенсibilизации затруднительно.

Учитывая современные формы ведения сельского хозяйства в России, подобный подход не может быть реализован, что предполагает разработку способов индивидуальной постановки симультанной пробы у отдельного животного. Кроме того, исследования различных авторов, изучающих микробиоценозы обусловленные нетуберкулёзными микобактериями, описали изменения процентного соотношения различных групп нетуберкулёзных микобактерий [127, 132, 136]. Перечисленное является основанием для разработки новых аллергодиагностикомов.

Значимой проблемой аллергической диагностики туберкулеза животных является анергия.

Анергия – это снижение или утрата иммунологической реактивности организма до полной потери способности реагировать на туберкулин и, как следствие – отсутствие аллергических реакций у больных туберкулезом животных.

Одной из значимых проблем при осуществлении комплекса оздоровительных мероприятий в неблагополучных по туберкулёзу животноводческих хозяйствах с использованием туберкулинов являются анергичные животные [118, 140, 141].

А.Н. Шаров указывал, что процесс развития туберкулеза в организме животного проходит различные стадии. Развитие анергии автор связывает с образованием в организме животного высокого титра противотуберкулёзных антител [227].

А.Н. Шаров, К.Н. Ауштрова считали, что состояние кожи оказывает значимо большое влияние на проявление аллергической реакции, при внутрикожном введении туберкулина. При этом учитывая, что в кожу в процессе цикла выращивания животного могут быть инъецированы различные препараты, формируются различные изменения, так как кожа является одним из элементов иммунной системы [3, 228].

Существует предположение, что длительное размножение туберкулёзных микобактерий приводит к появлению большой популяции супрессорных клеток и соответственно формированию и проявлению анергии [90].

Известно, что оздоровление неблагополучных хозяйств, как правило, проводят методом выявления и убоя больных животных, с использованием внутрикожной пробы с ППД для млекопитающих, которая не всегда выявляет всех больных туберкулезом животных [67, 121, 122].

Не реагирующие на туберкулин, анергичные животные, остаются в стаде, как основной источник инфекции, что приводит к длительному неблагополучию и даже безрезультативности оздоровительных мероприятий. Поэтому, при длительном неблагополучии или значительном распространении туберкулеза оздоровление стад рекомендуется проводить методом полной замены всего поголовья скота. Однако не всегда имеются возможности проводить оздоровительные мероприятия этим методом, особенно в крупных животноводческих хозяйствах. Поэтому изыскание возможности дополнительного выявления больных туберкулезом анергичных животных остается актуальным вопросом аллергической диагностики туберкулеза. В доступной зарубежной медицинской литературе выявлено несколько сообщений о возможности «повышения чувствительности к туберкулину» у пожилых людей методом нескольких введений туберкулина с различным интервалом.

*S. J. Buslin* и соавторы изучали феномен, называемый эффектом усиления. Авторы провели три внутрикожные пробы с интервалом 3 недели на 162 больных людях. При учёте реакции на первое введение выявили 12,3 %, на второе – 5,5 %, на третье – 3,1 % положительно реагирующих. Авторы указывают, что у хронически больных туберкулёзом людей только серия кожных тестов даёт достоверные сведения о чувствительности к туберкулину [255].

*J. M. Cauthen* и соавторы изучали применений двух-трёх проб с интервалом одна-три недели. При этом от 8,7 до 31,0 % людей реагировали только на третье введение туберкулина. Авторы считают целесообразным применение у пожилых людей двух-этапного метода диагностики, где первая проба – инициальная, затем ещё две пробы как более чувствительные [127].

*J. Seutkin* с соавторами изучали значение туберкулиновой пробы при введении микобактериального аллергена через 2 и 7 суток у 411 людей (средний возраст 74,1 года). Положительную реакцию выявили у 32 % людей, причём у 6 % реакции выявлены на второе, у 5 % - на третье введение туберкулина. Авторы рекомендуют людям старше 50 лет, проводить поэтапную туберкулинизацию, что позволяет полнее выявить зараженных туберкулезом людей [221].

В научной отечественной и зарубежной литературе имеются работы по применению двукратного и даже трёхкратного методов внутрикожного введения туберкулина.

Методически исследование предполагает внутрикожное введение крупному рогатому скоту ППД для млекопитающих, с последующим учетом аллергической реакции спустя 72 часа, после инъекции (при этом предусмотрено удаление из стада всех реагирующих). Всем животным, не реагировавшим на первую инъекцию, проводят повторную инъекцию туберкулином для млекопитающих в место предыдущей инъекции, с последующей четкой реакции через 24 часа. Аналогично осуществляют третий этап исследования.

При этом учитывая увеличение частоты регистрации неспецифических реакций на туберкулин для млекопитающих, использование двукратной или трехкратной аллергической пробы затрудняет аллергическую диагностику.



Так, как установили многие авторы, при повторных введениях туберкулина и учете реакции через 24 часа, воспалительные явления в месте введения не успевают исчезнуть, в результате чего до 15,0% (а при сенсibilизации атипичными микобактериями и до 80%) здоровых высоко реактивных коров могут реагировать с увеличением толщины кожной складки на 3 мм. В соответствии «Наставления по диагностике туберкулеза животных от 2022 года» в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах животные с такими реакциями считаются реагирующими и подлежат убою.

Кроме того, бесспорным является и факт, что 2–3 – кратные туберкулиновые пробы тоже не выявляют всех инфицированных микобактериями туберкулёза животных, в неблагополучных хозяйствах.

#### 2.5. Проблема неспецифических реакций при аллергической диагностике туберкулеза крупного рогатого скота. Совершенствование дифференциальной диагностики

На большом практическом материале продемонстрировано, что состояние гиперчувствительности замедленного типа, выявляемое при внутрикожном введении туберкулина, в среднем формируется за тридцать суток, после инфицирования животного организма микобактериями.

Внутрикожное введение туберкулина у инфицированных микобактериями животных характеризуется формированием воспалительной припухлости с максимальной интенсивностью к 72 часам. Указанный временной интервал сопровождается различными иммунологическими изменениями, в том числе инфильтрацией лимфоцитами и макрофагальными клетками, в месте инъекции аллергена.

Различными исследованиями продемонстрирована специфичность аллергической реакции, при использовании аллергена гомологичного

микобактерии, что является основой для аллергической диагностики микобактериальных инфекций животных.

Вместе с тем, учитывая наличие большого количества общеродовых антигенов, в различном соотношении у типичных и атипичных представителей микобактерий специфичность аллергической реакции снижается. Вместе с тем повышение специфичности аллергической реакции возможно путем совершенствования технологии изготовления, методик применения, а также использования комплексных аллергенов. Поэтому выявление аллергической реакции на туберкулин может характеризовать как инфицирование патогенными микобактериями, так и сенсibilизацию нетуберкулёзными микобактериями [228].

Исследованиями продемонстрировано широкое распространение атипичных микобактерий в различных климатических зонах на объектах окружающей среды, в том числе и в животноводческих помещениях, кормах, подстилке. При этом в различных условиях атипичные микобактерии на различных питательных субстратах размножаются и могут колонизировать организмы сельскохозяйственных животных [150].

ВИЭВ многолетними исследованиями, бактериологическими методиками, патологического материала от крупного рогатого скота, реагирующего на туберкулин, продемонстрировано, что наиболее часто, в соответствии классификации Раньона, детектируются представители четвертой группы.

Перекрестная сенсibilизация микобактериями животных явилась основанием для разработки вариантов дифференциальной диагностики, одним из которых является симультанная проба с гетерологичными аллергенами (ППД для млекопитающих и ППД для птиц). Указанный сравнительный тест стал широко использоваться во многих странах мира, в том числе и в России, на начальном этапе.

Поиски более эффективных вариантов симультанной пробы способствовало разработке комплексного аллергена, из атипичных микобактерий, который в сравнении с ППД для птиц продемонстрировал лучшие диагностические

показатели, особенно в хозяйствах с сенсбилизацией животных не туберкулёзными микобактериями [120, 132, 152].

Учитывая изменения экологических факторов атипичных микобактерий, в процессе борьбы с туберкулёзом, было продемонстрировано снижение диагностической эффективности КАМ, позволяющая дифференцировать аллергию от ноля до 80%. При этом использование КАМ позволяет проводить исследование в группе животных (не менее 6 реагирующих), что ограничивает проведение диагностики в частных фермерских хозяйствах и подворьях с численностью поголовья менее 6 голов.

В свою очередь, как было показано исследованиями, за период использования КАМ, использование симультанной пробы позволило значительно сократить количество животных, реагирующих на туберкулин. Так при тестировании животных (в благополучных хозяйствах) положительно реагирующих на предшествующее введение ППД для млекопитающих последующая симультанная проба одновременно с ППД для млекопитающих и КАМ сопровождается проявлением реакции на комплексный аллерген и её отсутствие на туберкулин для млекопитающих.

Дифференциальная диагностика и проведение дифференциации природы аллергической реакции в процессе установления туберкулёза животных финансово затратный процесс. В то же время прижизненная диагностика микобактериальных инфекций микобактериальными аллергенами позволяет только определить особей подозреваемых в инфицировании [301, 302, 304]. В свою очередь окончательный диагноз устанавливается на основании патологоанатомических исследований и лабораторных тестов [113].

Учитывая приведенные доводы, групповая симультанная проба может быть усовершенствована и выработаны критерии для осуществления индивидуальной симультанной пробы, что было продемонстрировано сотрудниками ВИЭВ. Так основным критерием для убоя, реагирующего животного должна являться более интенсивной на ППД для млекопитающих, или характеризующаяся равнозначной реакционностью как на ППД для млекопитающих, так и КАМ [147, 185].

Известно, что комплексный аллерген из атипичных микобактерий, производимый промышленным способом, представляет собой антигенный коктейль микобактерий *M. scrofulaceum* (вторая группа по Раньону) и *M. intracellulareae* (третья группа по Раньону). В свою очередь туберкулин очищенный ППД для птиц содержит антигены только микобактерий *M. avium* (третья группа по Раньону).

При этом учитывая результаты исследований по оценке процентного состава атипичных микобактерий изолируемые из организма крупного рогатого скота [127, 134, 151] видно, что приблизительно шестьдесят процентов из общего числа изолятов составляют атипичные микобактерии относящиеся к четвертой группе по классификации Раньона. Антигены атипичных микобактерий относящиеся к четвертой группе не включены в состав КАМ, что в свою очередь значительно снижает диагностическую ценность.

При этом инструкция по проведению и учету симультанной пробы была утверждена 28.11.1981 г. Главным управлением ветеринарии министерства сельского хозяйства и с учетом различных изменений в экологии микобактерий, ведении животноводства не менялась до настоящего времени более сорока лет, что предполагает внесение изменений.

Приведенные доводы определяют актуальность исследований по совершенствованию комплексных аллергенов и методики применения с учетом современных проблем борьбы с туберкулезом крупного рогатого скота.

## 2.6. Проблемы диагностики паратуберкулеза, совершенствование аллергической диагностики паратуберкулеза крупного рогатого скота

Паратуберкулез - это инфекционная болезнь, предпочтительно жвачных животных, характеризующаяся латентным хроническим течением, с поражением локализирующиеся в лимфатических узлах кишечника, клинически проявляющаяся диареей, истощением, а также снижением продуктивности [222].

В настоящее время известно, что период отсутствия симптоматики при паратуберкулёзе довольно длительный: от момента инфицирования до 15 лет. При этом латентные особи, как известно, являются причиной инфицирования здоровых особей. Таким образом, паратуберкулёз характеризуется особенностью: большое количество инфицированных животных в стаде, при наличии единичных клинических случаев проявления заболевания [128, 169, 188].

Указанная патология впервые была описана в 1895 году авторами: *A. Johne* и *L. Frothingham*, как особая форма туберкулёза, характеризующаяся поражением кишечника, предполагаемой этиологической причиной, которой являются микобактерии бычьего или птичьего вида, со сниженной вирулентностью [128, 188]. По имени первого научной автора публикации, заболевание получило название как болезнь Йоне [154]. Кроме того исторически заболевание также получило название - хронический псевдотуберкулезный энтерит [169, 232].

Успешная попытка изоляции возбудителя болезни из кишечника коровы была осуществлена *T.W. Twort* и *Y.Z. Ingram*, с последующей публикацией результатов исследований в 1912 году. Авторы предложили классифицировать возбудителя как *Mycobacterium enteridis chronicae bovis*.

Позднее возбудитель получил название *Mycobacterium paratuberculosis*, а заболевание соответственно - паратуберкулёз.

В эпоху развития молекулярно-генетических методов исследования различных микроорганизмов изучение возбудителя паратуберкулёза продемонстрировало его генетическое родство с микобактериями птичьего вида на 99%. Поэтому, позднее микобактерии паратуберкулёза классифицировали как подвид микобактерий птичьего вида – *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) [45, 46].

При этом, не смотря на более чем сто летнюю историю открытия возбудителя болезни Йоне, многие вопросы остаются не изученными.

Учитывая широкое распространение микобактерий паратуберкулёза в окружающей среде, в том числе экскретах животных, их идентификация ограничена методами бактериоскопии и молекулярно-генетическими методами

[285]. Кроме того, при данном заболевании не разработано высокоэффективных способов специфической профилактики, лечения, а также диагностики. Поэтому основным в борьбе с паратуберкулезом является комплексная диагностика [263, 347].

При этом, существенным фактором сдерживающим развитие методов диагностики и терапии паратуберкулёза связаны с необходимостью моделирования инфекционного заболевания. Так до настоящего времени не удалось в полной мере воспроизвести паратуберкулёзное заболевание.

Таким образом, существующие проблемы, связанные с диагностикой паратуберкулёза, можно разделить на три группы: пониженной специфичности и чувствительности существующих прижизненных диагностических тестов; отсутствием селективных питательных сред для культивирования паратуберкулёзных микобактерий; отсутствием лабораторной модели паратуберкулёзной инфекции.

Принимая во внимание международный документ, версия 2019 года - Кодекс здоровья наземных животных МЭБ альтернативными методиками тестирования животных на паратуберкулёз могут быть внутрикожный тест с туберкулином и ИФА, но рекомендованных тестов не предложено.

Анализ результатов исследований при развитии паратуберкулёза крупного рогатого скота, а также аналогичных патологических изменений в организме человека (заболевание классифицировано как болезнь Крона) явилось основанием противоречивых мнений относительно этиологической причины сравниваемых патологий. Так некоторые исследователя связывают болезнь Крона с инфицированием микобактериями паратуберкулёза, в то время как другие отрицают подобную взаимосвязь [128, 222].

Согласно современных эпизоотологических данных, паратуберкулёз животных, характеризуется мировым распространением. Заболевание сопровождается значительными экономическими потерями, включающие: снижение молочной продуктивности, невозможности протекания нормальной

беременности и соответственно выносить плод, потерей мышечной массы и как следствие выбраковка.

В сравнении с другими инфекционными заболеваниями жвачных животных, паратуберкулёз изучен недостаточно.

Нормативным документом в РФ, регулирующим проведение комплекса исследований при паратуберкулёзе является: «Наставление по диагностике паратуберкулеза животных», утвержденного Департаментом ветеринарии МСХ РФ 05.04.2001 г. Так в неблагополучных по паратуберкулёзу хозяйствах, исследования осуществляют для выявления больных животных. В благополучных хозяйствах исследования проводят подозреваемых животных. Верификация включает анализ эпизоотических данных по паратуберкулёзу, клинический осмотр, аллергические исследования, серологические исследования, комплекс исследований на секции [112].

Аллергическая диагностика паратуберкулёзной инфекции, в России, осуществляется с использованием ППД для птиц, с последующим учетом аллергической реакции спустя 72 часа, после внутрикожной инъекции. При этом, реагирующими признаются животные, у которых в месте инъекции развивается реакция 6 мм. и более.

Ниже представлены критерии, согласно которых в неблагополучных по паратуберкулёзу хозяйствах животных считают больными:

1. Имеющие выраженную клиническую симптоматику;
2. Характеризующиеся положительным результатом серологических и бактериоскопических исследований, на фоне неявно выраженной клинической симптоматики;
3. Характеризующиеся положительным результатом серологических и аллергических исследований, на фоне отсутствия клинических признаков заболевания.

Ранее в ВИЭВ авторами А.Г. Малаховым, Г.И. Устининовой, З.С. Газарх, на основании проведенных различных исследований была предложена методика экстракции и очистки биологически активных протеинов из биомассы

микобактерий. Используя разработанную методику с целью совершенствования аллергической диагностики паратуберкулеза, были изготовлены и изучены четыре серии ионина, из бактериальной массы *M. avium subspecies paratuberculosis* [84].

Биологическую активность ионинов оценивали в неблагополучных по паратуберкулёзной инфекции хозяйствах, специализирующихся на содержании крупного рогатого скота, а также в лабораторных условиях, на морских свинках сенсibilизированных различными видами микобактерий. В качестве контроля использовали ППД туберкулин для птиц.

На основании проведенных исследований сделано заключение, что ионины, изготовленные из *M. paratuberculosis*, по чувствительности и специфичности равноценны с ППД-туберкулином для птиц. Поэтому, дальнейшие исследования были направлены на изучение диагностической ценности ППД - туберкулинов для птиц, при аллергической диагностике паратуберкулёзной инфекции.

При дальнейших исследованиях, по сравнительному изучению диагностической ценности ППД туберкулина для птиц и альттуберкулина для птиц, проведенных в ВИЭВ, было установлено преимущество использования ППД для птиц, так как использование этого аллергена давало возможность пользоваться безыгольными инъекторами для внутрикожного введения туберкулина в объеме 0,2 мл. Кроме того, как недостаток альттуберкулина следует указать, что этот аллерген представляет собой маслянистую жидкость, которая легко взбивается в пену, которая забивает сопло инъектора и делает практически невозможной внутрикожное введение аллергена в объеме 0,4 мл. При сравнительном изучении ППД для птиц и его французского аналога «Авитубер», в хозяйствах, где была установлена сенсibilизация крупного рогатого скота атипичными микобактериями, установлено, что при использовании аллергена ППД для птиц реагировало 9,6-14,3% животных, а на «Авитубер» реагировало на 7,7% больше реагирующих животных с парааллергическими реакциями на туберкулин. В результате проведенных исследований предложен подход аллергического исследования на паратуберкулёз крупного рогатого скота с использованием пониженной дозировки туберкулина



для птиц (равная 2500 МЕ). Кроме того, с учетом того, что неспецифические реакции, как правило выявляются увеличением кожной складки на 3-5 мм. (у 80-90% животных) сделано предложение за положительную реакцию считать реагирующих животных характеризующиеся утолщением кожной складки в месте инъекции на 6 и более мм.

С учетом изложенного, паратуберкулез остается наименее изученной инфекцией, чем другие хронические болезни животных.

Вместе с тем, до настоящего времени нет единства относительно диагностической эффективности в практической ветеринарии двух диагностических препаратов: паартуберкулина и туберкулина для птиц. Так одной из основных диагностических проблем, возникающие при тестировании животных, характеризующиеся сенсibilизацией нетуберкулёзными микобактериями и соответственно реагирующие на инъекцию диагностической дозы туберкулина для птиц. Кроме того другой проблемой является отсутствие аллергической реакции у животных характеризующиеся латентно протекающей паратуберкулёзной инфекцией в неблагополучных по паратуберкулёзу стадах.

### 3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (г. Москва), в соответствии с утвержденными планами научно-исследовательских работ, отдельные эксперименты проведены на ФКП «Курская биофабрика», в период 2010-2023 г.

#### 3.1. Материалы и методы

##### 3.1.1. Материалы

**Штаммы микроорганизмов:** В работе использовали следующие лиофилизированные производственные и музейные штаммы микобактерий, полученные из коллекций ФГБНУ «Федеральный научный центр - всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», а также Федерального государственного учреждения всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов Всероссийского Государственного научно-контрольного института: *M. bovis*, штаммы: AN-5, 8-88, БЦЖ; *M. avium*, штамм 22-82; *M. intracellulae*, штамм, S- 13 C; *M. scrofulaceum*, штамм N 12; *M. fortuitum*, штамм 18023; *M. avium subspecies paratuberculosis* штамм 19698 ATCC.

Предварительно штаммы микобактерий были тестированы с использованием культуральных и биохимических методик, молекулярно-генетических методик подтверждающие их видовую принадлежность. Штаммы микобактерий сохраняли и поддерживали на среде Павловского, с периодичностью пересевов один раз в 2-3 месяца. В исследованиях использовали микобактериальную массу, из которой приготавливали суспензии для сенсibilизации животных весовым методом. Термоинактивация

микобактериальной массы, для изучения сенсibiliзирующих свойств, осуществляли при температуре 121°C, в течение часа.

**Растворы:** натрия хлорида 0,9%, (pH 6,5 - 7,5); фенола в дистиллированной воде 0,3 %; ТХУ 50%; уксусной кислоты 10% (pH 4,0-5,0); сернокислого аммония насыщенный раствор; нашатырного спирта 10% (pH 7,2-7,4); 30% раствор гидроокиси натрия; концентрированная серная кислота.

**Питательные среды:** Павловского, мясопептонный агар, мясопептонный бульон, мясопептонный печеночный бульон, Сабуро, Тиоглекосеволая, ФАСТ-3Л.

#### **Микобактериальные аллергены:**

Первый Международный стандарт бычьего очищенного туберкулина *PPD – bovine* (представлен *NIBSC*, Великобритания);

Первый Международный стандарт птичьего очищенного туберкулина *PPD - avium* (представлен *NIBSC*, Великобритания);

Туберкулин очищенный ППД для млекопитающих (производитель: «Курская биофабрика»);

Туберкулин очищенный ППД для птиц (производитель: «Курская биофабрика»);

Аллерген очищенный комплексный из атипичных микобактерий (производитель: «Курская биофабрика»);

Аллерген очищенный комплексный из атипичных микобактерий, КАМ-2 (производитель: ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН);

Аллерген очищенный комплексный из атипичных микобактерий, КАМ-3 (производитель: ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН);

Комплексный аллерген «Параавиум» (производитель: ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН);

*Perlsucht – Tuberculin* (производитель: фирма *Beringwerke* Германия).

*Albumosefreies Rinder-Tuberculin* (производитель: фирма *Beringwerke*, Германия).

*Intravac poly tuberculine bovine HCSM* (производитель: фирма Рон-Мерье, Франция).

**Животные.** Исследования проведены на морских свинках, альбиносах массой 400 - 600 г. Морские свинки, для проведения исследований, были приобретены в специализированном питомнике лабораторных животных ФГБНУ НЦБМТ ФМБА России п. Крюково. Всего для проведения исследований было использовано более 1347 животных. Животные прошли карантин и не имели клинических признаков заболеваний. В период карантирования морских свинок тестировали аллергическим способом, на микобактериальные инфекции. Морские свинок формировали в группы, в зависимости от исследования, с различным содержанием особей. Животных содержали в равнозначных условиях.

Крупный рогатый скот, инфицированный микобактериями туберкулёза бычьего вида. Для осуществления различных исследований было использовано свыше 100 голов инфицированных животных (коровы).

**Приборы и оборудование:** ламинарный бокс *FASTER Bio 72*; водяная баня *STEGLER Model-ТБ-6А*; автоклав ГК-100-3; аквадистиллятор медицинский электрический АЭ-10; микроскоп микромед 3 ЛЮМ; термостат электрический суховоздушный охлаждающий ТСО-200 СПУ; шкаф сушильный ШС-200 СПУ; иньектор безыгольный БИ-7; кутиметр ветеринарный электронный; центрифуга Т-24 автоматические дозаторы; шприцы 1,0; 5,0; 10,0 мл, иглы инъекционные, пинцеты, ножницы, зажимы, бикс; рН метр; холодильник бытовой (установленный температурный режим) от 4 °С до 8 °С)

**Расходные материалы:** пакеты микробиологические с застежкой; пробирки микробиологические, наконечники для автоматических дозаторов; пипетки стеклянные, объемом 1, 2, 5, 10, 25, 50 мл., вата, марля, дезинфицирующие средства.

### 3.1.2. Методы исследования

#### **Оценка содержания белковых соединений**

Оценку содержания микобактериальных белковых соединений, осуществляли по методике Кьельдаля. Для более точной оценки содержания белковых соединений, в образцах микобактериальных аллергенов, проводили исследования каждого образца, в трех повторностях. Для этого смешивали 3 мл. раствора микобактериального аллергена и 3 мл. 20% раствора трихлоруксусной кислоты. Реакционную смесь выдерживали в границах температурного режима 4-6° С, в течение 320 минут (в указанный период происходила денатурация белковых производных). Осажденный белок промывали 5% раствором трихлоруксусной кислоты, трижды, на обеззоленном фильтре. После этого фильтр с белком помещали в Кьельдалевскую колбу, содержащей 5 мл. концентрированной серной кислоты и нагревали до температуры от 300 до 400 °С. Через каждый временной интервал равный 60 минутам, в смесь вносили перекись водорода, в объеме по 0,5 мл. Нагревание осуществляли до полного обесцвечивания раствора. После этого проводили отгонку в колбе для отгона, с отмыванием остатков дистиллированной водой. Полноту отмывки контролировали метиловым оранжевым.

В коническую колбу вносили 15 мл. раствора серной кислоты и 15 капель индикатора Таширо. Используя 30% раствор гидроокиси натрия, реакционную смесь в колбе нейтрализовали, с последующим отгонкой, окончание которой оценивали по индикаторной бумаге. Содержимое приемной колбы титровали раствором натрия гидроокиси, с индикатором Таширо. Кроме того аналогично проводили определение содержания азота в обеззоленном фильтре. Расчет содержания белка производили в соответствии формулы:

$$C = ((V_{г.н.ф} - V_{г.н.и}) \times ПК) / V_{п} \times 8,75$$

Где:

$V_{г.н.ф}$  - количество гидроокиси натрия, израсходованное на обеззоленный фильтр;

$V_{г.н.и}$  - количество гидроокиси натрия, израсходованное на титрование испытуемого образца;

ПК - поправочный коэффициент к титру раствора гидрооксида натрия;

$V_{п}$  - количество исследуемой пробы [34].

### **Определение концентрации водородных ионов**

Исследование рН проводили потенциометрическим методом, с помощью рН - метра [34].

### **Определение активности микобактериальных аллергенов**

Активность микобактериальных аллергенов оценивали на морских свинках, сенсibilизированных соответствующими видами микобактерий. Тестирование параметра активность осуществлялось через 30-35 суток после введения микобактериальной суспензии (период развития состояния ГЗТ).

Разведения микобактериальных аллергенов инъецировали в объеме 0,1 см<sup>3</sup>. Оценку биологической активности рассчитывали в сравнении с эталонным образцом микобактериального аллергена. Активность выражали либо в Международных единицах (туберкулин для млекопитающих и туберкулин для птиц), либо Единицах активности (аллергены из атипичных микобактерий), на гомологично сенсibilизированных морских свинках. При получении расчетного значения коэффициента относительной активности активность выражали умножением на значение активности контрольного препарата. В отношении ППД для млекопитающих значение активности равнялось 10000 МЕ/мл., в отношении ППД для птиц аналогичное значение составляло 25000 МЕ/мл., в отношении КАМ значение активности равнялось 6750 ЕД/мл. Активность микобактериальных препаратов должна соответствовать 66-150% от номинальной активности [100, 101, 105].

### **Оценка специфичности микобактериальных аллергенов**

Проводили на гетерологично иммунизированных морских свинках. Специфичность микобактериальных аллергенов выражали в процентах. Для этого рассчитывали относительную активность в отношении гетерологичного туберкулина с учетом кратности между дозами препаратов и выражали в процентах. Значение менее 10% является критерием пригодности аллергена [274, 275].

### **Определение реактогенности микобактериальных аллергенов**

Для исследования использовали по три морские свинки, не использованные ранее в экспериментах, массой более 400 гр. У животных депилировали шерсть с боковых поверхностей, обрабатывали кожу антисептиком и инъецировали по 500 МЕ (ЕД) разведения микобактериального аллергена, с последующим учетом через 24 часа. Интенсивность реакции менее пяти мм. свидетельствует о пригодности аллергена [274, 275].

### **Оценка лейкоцитарной формулы**

Оценку лейкоцитарной формулы осуществляли после отбора крови и приготовления мазков, которые высушивали на воздухе, фиксировали в этиловом спирте в течение 30 минут и окрашивали раствором азур-эозина, в течение 15 минут. После этого мазки крови промывали в водопроводной воде и сушили на воздухе. Подсчет форменных элементов крови проводили под масляной эмерсией, при увеличении  $\times 1000$  [44].

### **Оценка фагоцитарной активности клеток крови**

Оценку фагоцитоза нейтрофилов крови морских свинок осуществляли параллельно при определении лейкоцитарной формулы. Для этого пробу крови в количестве 100 мкл. вносили в смесь, содержащую антикоагулянт (гепарин) и латексные частицы на питательной среде ИГЛА. Смесь перемешивали встряхиванием. Далее осуществляли культивирование в термостате, при 37°C., в течение 60 минут, с периодическим перемешиванием через каждые 10 минут. По окончании периода культивирования образцы охлаждали до 5°C, в течение 5 минут. После этого в образцы вносили по 800 мкл. среды ИГЛА. Перемешивали

встряхиванием и центрифугировали при 1500 об/10 мин. Удаляли надосадов в количестве 800 мкл., а осадок ресуспендировали и приготавливали мазки, аналогично как и при приготовлении мазков крови. При проведении микроскопии под масляной эмерсией, учитывали нейтрофилы и подсчитывали количество поглощенных ими латексных частиц. В каждом мазке подсчитывали по 100 нейтрофилов. Рассчитывали процент фагоцитоза и фагоцитарное число [266].

### **Сравнительные исследования микобактериальных аллергенов на крупном рогатом скоте**

При осуществлении исследований на крупном рогатом скоте, микобактериальные аллергены вводили в объёме 0,2 см<sup>3</sup> в область средней части шеи, в предварительно выстриженные от шерсти участки кожи. Введение нескольких разведений микобактериальных аллергенов осуществлялось на расстоянии не менее 20 см. Введение препаратов осуществлялось безыгольным инъектором, учет реакции осуществлялся через 72 часа, после введений разведений микобактериальных аллергенов, при помощи кутиметра. Животных содержали на стандартном рационе кормления в стандартных условиях. Используемые животные не имели внешних признаков прогрессирования заболевания.

### **Статистическая обработка результатов исследования**

Статистический анализ полученных экспериментальных результатов оценивали при использовании общепринятых методов. Оценку достоверности различия между сравниваемыми значениями проводили в соответствии критерия Стюдента [70].

При проведении сравнительной оценки микобактериальных аллергенов на сенсibilизированных морских свинок также с использованием критерия  $z$ , при использовании одной дозы тестируемого и одной дозы контрольного препаратов [7]. При использовании несколько доз тестируемого препарата и несколько доз контрольного оценивали относительную активность [88, 357].



## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 4.1. Совершенствование условий оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов

#### 4.1.1. Изучение сенсibilизирующих свойств микобактерий *M. bovis*

При оценке показателя биологическая активность ППД для млекопитающих, и специфичность туберкулина ППД для птиц используются морские свинки, сенсibilизированные микобактериями туберкулёза бычьего вида - *M. bovis*. В различных литературных источниках, в том числе и нормативной документации, указано, что в качестве выбора сенсibilизирующего агента могут быть использованы (без указания предпочтительности) вирулентные, авирулентные или инактивированные микобактерии [28, 31, 32].

Вместе с тем предполагается, что указанные варианты сенсibilизации не являются равнозначными, в связи, с чем было проведено сравнительное исследование вариантов сенсibilизации.

В исследованиях были использованы варианты сенсibilизации морских свинок вирулентными, авирулентными и инактивированными микобактериями бычьего вида. В связи с тем, что патогенные микобактерии вызывают туберкулёзный процесс, вариант, предполагающий использование вирулентных микобактерий, являлся контрольным. Оценка вариантов сенсibilизации осуществлялась по интенсивности и проценту реагирующих животных, на различные дозировки ППД туберкулина для млекопитающих и по интенсивности и проценту реагирующих животных на различные дозы ППД для птиц.

Использование в опыте ППД для млекопитающих позволило характеризовать интенсивность развития сенсibilизации, а ППД для птиц -

специфичность сенсibilизации. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1- Чувствительность и специфичность вариантов сенсibilизации морских свинок живыми и инактивированными микобактериями *M. bovis*

<b>Животные, сенсibilизированные <i>M. bovis</i> штамм №8 (вирулентные) (n=6), контрольная группа</b>				
Показатели	ППД туберкулин для млекопитающих		ППД туберкулин для птиц	
Доза туберкулина	25 МЕ	5 МЕ	125 МЕ	25 МЕ
M±m	14,75±1,50	11,25±1,27	4,96±2,50	0
Процент реагирующих животных	100	100	50	0
<b>Животные, сенсibilизированные <i>M. bovis</i> штамм БЦЖ (авирулентные) (n=6)</b>				
Доза туберкулина	25 МЕ	5 МЕ	125 МЕ	25 МЕ
M±m	16,58±0,74	13,41±1,19	10,50±0,76	0
Процент реагирующих животных	100	100	100	0
<b>Животные, сенсibilизированные <i>M. bovis</i> штамм №8 (инактивированные) (n=6)</b>				
Доза туберкулина	25 МЕ	5 МЕ	125 МЕ	25 МЕ
M±m	20,67±1,29*	16,17±0,54*	14,08±0,71	11,25±1,02
Процент реагирующих животных	100	100	100	100

**Примечание:** \*разница достоверна при  $p < 0,05$

Из полученных результатов выявлено, что в группе морских свинок, сенсibilизированных инактивированными микобактериями интенсивность аллергической реакции на туберкулин для млекопитающих, в дозах 25 и 5 МЕ достоверно выше - 20,67±1,29 и 16,17±0,54, в сравнении с контрольной группой 14,75±1,50 и 11,25±1,27, соответственно. Интенсивность аллергической реакции в группе морских свинок, сенсibilизированных микобактериями, с пониженной вирулентностью на дозы: 25 и 5 МЕ соответствовала 16,58±0,74 и 13,41±1,19 и достоверно не отличается от значений интенсивности аллергической реакции контрольной группы морских свинок 14,75±1,50 и 11,25±1,27 соответственно.

При этом процент реагирующих животных на не одинаковые дозы туберкулина для млекопитающих во всех группах морских свинок соответствовал 100.

Сопоставление значений аллергической реакции в гомологичной системе, на дозы туберкулина очищенного ППД для млекопитающих, убедительно показала предпочтительность применения сенсibilизации морских свинок инактивированными микобактериями (интенсивность реакции выше), то есть выше чувствительность.

Оценка специфичности вариантов сенсibilизации осуществлялось по интенсивности аллергической реакции, на дозы туберкулина для птиц, равные: 125 и 25 МЕ.

Так, в группе морских свинок, сенсibilизированные вирулентными микобактериями, процент реагирующих животных на дозу 125 МЕ ППД туберкулина для птиц соответствовал 50, а при использовании дозы 25 МЕ-0.

В группе животных, сенсibilизированных инактивированными микобактериями, процент реагирования на дозировки: 125 и 25 МЕ ППД туберкулина для птиц соответствовал - 100. В группе морских свинок, сенсibilизированных микобактериями с пониженной вирулентностью, процент реагирующих животных на дозу 125 МЕ соответствовал 100, а на дозу 25 МЕ - 0. Исходя из полученных результатов, очевидно, что вариант сенсibilизации морских свинок предполагающий использование авирулентных микобактерий, по специфичности является, наиболее близким контрольному варианту, в то время как вариант предполагающий использование инактивированных микобактерий является низко специфичным.

Учитывая полученные результаты исследований и предпочтительность использования для сенсibilизации морских свинок авирулентные микобактерии следующим этапом было определение оптимальной дозы авирулентных микобактерий для оценки иммунобиологических критериев туберкулиновых аллергенов, обеспечивающее оптимальное соотношение чувствительности и специфичности варианта сенсibilизации морских свинок.

При реализации исследования было сформировано 4 группы морских свинок, которых сенсibilизировали разными дозами *M. bovis* штамм БЦЖ: 0,4 мг внутрикожно, 0,2 мг внутрикожно, 0,2 мг подкожно, 0,1 мг внутрикожно. Использование внутрикожного способа введения микобактерий обусловлено минимальной частотой случаев побочных эффектов (системной инфекции, абсцессов и др.) [72].

Через месяц, после введения микобактерий морским свинкам, была оценена иммуногенность и чувствительность вариантов сенсibilизации.

В исследовании были использованы дозы ППД туберкулина для млекопитающих в диапазоне от 1 МЕ до 125 МЕ. Вариантом сравнения сенсibilизации была использована группа морских свинок, которым вводили микобактерии в дозе 0,2 мг внутрикожно, использование которого регламентировано ГОСТ 16739 [31]. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Чувствительность вариантов сенсibilизации морских свинок разными дозами *M. bovis* штамм БЦЖ

Показатели		Вариант и доза сенсibilизации морских свинок							
		0,1 мг, в/к		0,2 мг, п/к		0,2 мг, в/к		0,4 мг, в/к	
		4 группа (n=10)		3 группа (n=10)		2 группа (n=10)		1 группа (n=10)	
		M±m	ПРЖ	M±m	ПРЖ	M±m	ПРЖ	M±m	ПРЖ
Доза туберкулина, МЕ	125	16,5*±0,96	100	16,6*±0,80	100	17,9±1,58	100	18,75*±1,92	100
	25	14,2*±0,90	100	13,5*±1,05	100	15,3±1,16	100	15,63±0,83	100
	5	11,5*±1,04	100	12,1*±0,83	100	13,1±1,50	100	11,75*±0,6	100
	1	0	0	7,25	40	10±2,34	100	8,5	20

**Примечание:** \*Разница достоверна при  $p < 0,05$

Сокращения: в/к – внутрикожно; п/к – подкожно, ПРЖ- процент реагирующих животных.

Сопоставление средних значений, полученных при использовании различных доз ППД туберкулина в первой, третьей и четвертой группах со значениями второй группы продемонстрировало различие. Так при использовании дозы 125 МЕ, в первой группе, интенсивность аллергической реакции была выше, а в третьей и четвёртой группах интенсивность аллергической реакции была достоверно ниже, в сравнении со второй группой.

При использовании дозы 25 МЕ, интенсивность реакции в первой группе не отличалась от контроля, вместе с тем в группах 3 и 4 интенсивность реакции была достоверно ниже, чем в контроле. При использовании дозы 5 МЕ интенсивность в 1,3,4 группах была ниже, в сравнении с контролем. При использовании дозы 1 МЕ интенсивность в 1,3,4 группах по сравнению со второй не оценивалась, в связи с различной реакционностью животных, выраженная в процентах. Оценка процента реагирующих животных продемонстрировала, что использование дозировок ППД для млекопитающих в диапазоне от 5 МЕ до 125 МЕ, во всех группах, обуславливало значение, соответствующее 100, в то время как при использовании дозы 1 МЕ процент реагирующих животных был максимальным во второй группе, при отсутствии аллергической реакции в четвёртой группе, и характеризовался минимальными значениями в третьей и первой группах.

Таким образом, из представленных результатов исследований, следует, что оптимальным сочетанием иммуногенности и чувствительности характеризуется вариант сенсibilизации морских свинок, предполагающий внутрикожное введение *M. bovis* штамм БЦЖ, в дозе 0,2 мг.

#### 4.1.2. Изучение сенсibilизирующих свойств микобактерий *M. avium*

Для оценки биологической активности ППД для птиц, а также специфичности ППД для млекопитающих Международной и Российской нормативной документацией предусмотрено использование сенсibilизированных микобактериями птичьего вида морских свинок [274, 275]. При этом вариантами сенсibilизации могут быть как живые, так и инактивированные микобактерии [19, 28, 31]. В свою очередь нормативной документацией не регламентирована предпочтительность использования того или иного варианта сенсibilизации. Вместе с тем, с учетом проведенных ранее исследований с использованием микобактерий бычьего вида целесообразно предположить не равнозначность указанных вариантов сенсibilизации.

Поэтому, следующим этапом наших исследований было изучение иммунобиологических параметров вариантов сенсибилизации *M. avium* морских свинок.

В связи с тем, что живые, патогенные микобактерии *M. avium* вызывают туберкулёзный процесс у птиц разных видов, вариант, предполагающий использование живых вирулентных микобактерий, являлся контрольным. В свою очередь у морских свинок микобактерии птичьего вида патологических процессов, аналогичных птице не вызывают [221].

Оценку вариантов сенсибилизации проводили по интенсивности кожной реакции ГЗТ и проценту морских свинок характеризующиеся реакционностью на не одинаковые дозировки аллергена для млекопитающих и аллергена для птиц. При осуществлении исследования специфичность сенсибилизации характеризовали по реакционности на туберкулин для млекопитающих, а чувствительность по реакционности на туберкулин для птиц. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Представленная таблица демонстрирует, что в группе животных иммунизированных микобактериями *M. avium*, аллергическая реакция регистрируется на дозировки ППД туберкулина для птиц в 100% случаев интенсивностью на 25 МЕ -  $14,75 \pm 1,50$  и 5 МЕ -  $11,25 \pm 1,27$ . На ППД для млекопитающих на дозу 125 МЕ реагирующие животные составил 50%, а интенсивность реакции -  $4,96 \pm 2,50$ . При использовании дозы 25 МЕ - реакция не выявлена.

В группе морских свинок, сенсибилизированных микобактериями (инактивированные температурой) на дозы ППД для птиц 25 МЕ интенсивность реакции составила  $16,58 \pm 0,74$ , а на дозу 5 МЕ -  $13,41 \pm 1,19$  при 100% проявлении реакции. На дозу ППД для млекопитающих 125 МЕ интенсивность реакции была значительно выше, чем в группе морских свинок сенсибилизированных живыми микобактериями  $10,50 \pm 0,76$  и 100% чувствительностью, в то время как при использовании дозировки 25 МЕ кожная реакция ГЗТ не выявлялась.

Таблица 3 – Чувствительность и специфичность вариантов сенсibilизации животных живыми и инактивированными *M. avium*

Группа морских свинок сенсibilизированные <i>M. avium</i> штамм №22-82 (вирулентные) (n=6)				
Показатели	ППД для млекопитающих		ППД для птиц	
Доза аллергена	125 МЕ	25 МЕ	25 МЕ	5 МЕ
M±m	4,96±2,50	0	14,75±1,50	11,25±1,27
Процент реагирующих животных	50	0	100	100
Группа морских свинок сенсibilизированные <i>M. avium</i> штамм №2282 (инактивированные) (n=6)				
Доза аллергена	125 МЕ	25 МЕ	25 МЕ	5 МЕ
M±m	10,50±0,76	0	16,58±0,74	13,41±1,19
Процент реагирующих животных	100	0	100	100

**Примечание:** \*разница достоверна при  $p < 0,05$ .

Таким образом, вариант сенсibilизации морских свинок, предполагающий использование инактивированных микобактерий, является более чувствительным, но менее специфичным в сравнении с вариантом, предполагающим применение живых вирулентных микобактерий, что определяет предпочтительность использования живых микобактерий при оценке биологических характеристик туберкулиновых аллергенов.

Учитывая полученные данные, следующим этапом исследования было определение дозы живых микобактерий, обеспечивающих оптимальное соотношение иммуногенности и чувствительности, для определения биологических параметров туберкулиновых аллергенов.

При реализации этого этапа исследования были сформированы четыре группы морских свинок, сенсibilизированных разными дозами живых *M. avium*, штамм 22-82: 0,1 мг внутрикожно, 0,2 мг внутрикожно, 0,2 мг подкожно, 0,4 мг внутрикожно и 5 мг подкожно. В исследовании были использованы дозы ППД туберкулина для птиц: от 1 МЕ до 625 МЕ.

Через месяц, после введения микобактерий, оценивали чувствительность и специфичность вариантов сенсibilизации морских свинок живыми *M. avium*. Результаты исследования представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Чувствительность вариантов сенсibilизации морских свинок разными дозами живых *M. avium*

Показатели		Вариант и доза сенсibilизации морских свинок							
		0,1 мг в/к		0,2 мг в/к		0,4 мг в/к		5 мг п/к	
		1 группа (n=10)		2 группа (n=10)		3 группа (n=10)		4 группа (n=10)	
		M±m	ПРЖ	M±m	ПРЖ	M±m	ПРЖ	M±m	ПРЖ
Доза туберкулина, МЕ	625	15,5± 0,66*	100	17,0± 0,65*	100	22,0± 0,60*	100	19,25± 0,70	100
	125	14,5± 1,33*	100	15,0± 1,20*	100	18,5± 1,40	100	18,5± 0,80	100
	25	8,5	80	10,5± 0,89*	100	17,0± 0,80	100	16,0± 1,22	100
	5	6,5	40	10,0± 0,5*	100	15,5± 0,90	100	14,5± 0,80	100
	1	0	0	8,0± 0,4*	100	9,0± 0,77	100	10,5± 0,90	100

**Примечание:** \*Разница достоверна при  $p < 0,05$ .

Сокращения: в/к – внутрикожно; п/к – подкожно, ПРЖ- процент реагирующих животных.

Данные таблицы показывают, что в первой группе морских свинок, иммунизированных микобактериями – *M. avium* при использовании дозировки 0,1 мг/см<sup>3</sup>, интенсивность аллергической реакции на дозы ППД для птиц 625 и 125 МЕ, в сравнении со значениями других групп, была достоверно ниже. При этом интенсивность реакции на дозы ППД для птиц 25 и 5 МЕ, а также процент реагирующих животных, в сравнении со 2, 3, 4, и 5 группами были значительно ниже. Результаты исследования, полученные в первой группе морских свинок, свидетельствуют о сниженной чувствительности и нецелесообразности использования этого варианта для оценки иммунологических и биологических характеристик туберкулиновых аллергенов.

Вариант сенсibilизации морских свинок второй группы характеризуется повышенной чувствительностью в сравнении с первой группой, но меньшей чувствительностью, чем 3 и 4 группы.



Анализ значений кожной реакции ГЗТ в третьей группе характеризуются равнозначностью с таковым и в 4 группе. Так интенсивность туберкулиновой реакции на различные дозировки аллергена, а также процент реагирующих животных достоверно не отличаются в 3 и 4 группах морских свинок.

Таким образом, установлено, что для оценки активности ППД для птиц и специфичности ППД для млекопитающих оптимальным вариантом сенсibilизации является подкожное введение микобактерий птичьего вида в дозе 5 мг.

#### 4.1.3. Изучение сенсibilизирующих свойств атипичных микобактерий

Для определения активности и типовой специфичности комплексного очищенного аллергена из атипичных микобактерий (КАМ) применяются иммунизированные нетуберкулёзными микобактериями морские свинки [7].

При этом, с учетом пониженной сенсibilизирующей способности нетуберкулёзных микобактерий, необходим подбор варианта сенсibilизации приемлемый для лабораторной оценки биологических характеристик микобактериальных аллергенов из нетуберкулёзных микобактерий.

При осуществлении экспериментальных исследований были использованы дозировки от 1 до 10 мг., инъецируемые подкожно, внутрикожно по схеме однократно и двукратно.

При оценке сенсibilизирующих свойств атипичных микобактерий в соответствии требований классической методики [113] были использованы дозы КАМ -10 ЕД, а ППД для млекопитающих - 5 МЕ.

Результаты изучения сенсibilизирующих свойств *M. intracellulae*, *M. scrofulaceum* и *M. fortuitum*, при использовании различных дозировок, и путей введения в организм морских свинок, представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Чувствительность и специфичность вариантов сенсibilизации морских свинок живыми *M. intracellulatae*, *M. scrofulaceum* и *M. fortuitum*

Доза микобактерий	Показатель и	Сенсibilизация морских свинок микобактериями					
		<i>M. intracellulatae</i>		<i>M. scrofulaceum</i>		<i>M. fortuitum</i>	
		Аллерген					
		КАМ 10ЕД	ППД 5 МЕ	КАМ 10 ЕД	ППД 5 МЕ	КАМ 10 ЕД	ППД 5 МЕ
10 мг* п/к	х	17,5	9,5	19,5	7,5	10,33	0
	ПРЖ	100	33	100	100	100	0
10 мг п/к	х	13,5	9,5	14,33	12	11,67	0
	ПРЖ	100	67	100	33	100	0
5 мг* п/к	х	17	9,75	15,83	0	10,83	0
	ПРЖ	100	67	100	0	100	0
5 мг п/к	х	13,33	0	14,67	9	10,5	0
	ПРЖ	100	0	100	33	100	0
2,5 мг п/к	х	11,17	0	13	0	0	0
	ПРЖ	100	0	0,67	0	0	0
1 мг п/к	х	11,25	0	10	0	0	0
	ПРЖ	67	0	67	0	0	0
1 мг в/к	х	16,17	8,0	17	8	10,5	0
	ПРЖ	100	67	100	33	100	0

**Примечание:** \* введение микобактерий с интервалом 14 суток.

Сокращения: в/к – внутрикожно; п/к – подкожно, ПРЖ- процент реагирующих животных.

Результаты, полученные при внутрикожном способе введения микобактерий *M. intracellulatae* свидетельствуют о развитии кожной реакции ГЗТ на 10 ЕД КАМ с интенсивностью 16,17 мм. и проценту реагирующих животных равном 100. В тоже время интенсивность реакции на ППД для млекопитающих составляет 8 мм., процент реагирующих животных - 67. В группе морских свинок, сенсibilизированных *M. scrofulaceum* интенсивность реакции на КАМ соответствовала 17 мм., а процент реагирующих животных составил 100. В то время как интенсивность реакции на ППД для млекопитающих соответствовала 8,0 мм., процент реагирующих животных - 33. В группе морских свинок, сенсibilизированных *M. fortuitum* реакция регистрировалась только на КАМ в 100% случаев, с интенсивностью 10,5 мм.

В группах морских свинок, которым инъецировали микобактерии *M. intracellulatae* и *M. scrofulaceum*, использование дозировки 1 мг подкожно характеризовалось развитием кожной реакции ГЗТ на КАМ в 67 % и

интенсивности реакции на ППД для млекопитающих (интенсивность 11,25 и 10,0 мм. соответственно) при отсутствии реакции в группе морских свинок, сенсibilизированных *M. fortuitum*, что свидетельствует о недостаточном уровне сенсibilизации и предполагает увеличение дозировки. При этом применение дозы 2,5 мг., при сенсibilизации животных *M. intracellulae* сопровождается проявлением кожной реакции на аллерген - КАМ с интенсивностью 11,17 мм., в 100% случаев, в свою очередь в группе животных, сенсibilизированных *M. scrofulaceum* выявлена реакция на КАМ в 67% и интенсивностью 13,0 мм. При этом кожная реакция ГЗТ на аллергены в группе морских свинок, сенсibilизированных *M. fortuitum* отсутствовали, что обуславливает необходимость увеличения дозировки микобактерий.

Использование для сенсibilизации морских свинок - дозы 5 мг. сопровождалось развитием более интенсивной кожной реакции ГЗТ на КАМ в группах морских свинок сенсibilизированные *M. intracellulae*, *M. scrofulaceum*, и проявлением реакции *M. fortuitum*, у всех животных, в сравнении с дозами 1 и 2,5 мг. Так в группе морских свинок, сенсibilизированных *M. intracellulae* кожная реакция регистрировалась в 100% случаев только на КАМ с интенсивностью 13,33 мм. Реакция на ППД для млекопитающих не регистрировалась. В группе морских свинок, сенсibilизированных *M. scrofulaceum* реакция регистрировалась в 100% на КАМ с интенсивностью 14,67 мм. При этом в данной группе выявлялась реакция на ППД для млекопитающих с интенсивностью 9,0 мм. в 33% случаев.

Так в группе морских свинок, которым инъецировали *M. intracellulae* интенсивность реакции на КАМ составила 17 мм. в 100% случаев, а интенсивность реакции на ППД для млекопитающих составила 9,75 в 67% случаев. В группе морских свинок, сенсibilизированных *M. scrofulaceum* интенсивность реакции на КАМ соответствовала 15,83 мм. в 100% случаев.

Реакция на ППД для млекопитающих не выявлена. Животным, которым вводили микобактерии *M. fortuitum* реакция на КАМ выявлена в 100% с интенсивностью 10,83 мм.

Применение двукратного введения микобактерий в дозе 5 мг., в сравнении с однократной инъекцией, сопровождалось более интенсивной реакцией на аллерген из атипичных микобактерий. При этом в группе морских свинок двукратно сенсibilизированных *M. intracellulatae* в дозе 5 мг. регистрировалась кожная туберкулиновая реакция на ППД для млекопитающих в 67% случаях (отсутствие реакции при однократной инъекции микобактерий *M. intracellulatae* в дозе 5 мг.).

Использование дозировки микобактерий 10 мг, у животных сенсibilизированных *M. intracellulatae*, характеризовалось развитием реакции повышенной чувствительности на КАМ, с интенсивностью 13,5 мм. в 100% случаев, а на ППД для млекопитающих в 67%, с интенсивностью 9,5 мм. У животных, которым инъецировали *M. scrofulaceum* регистрировались кожная реакция ГЗТ на КАМ с интенсивностью 14,33 мм. в 100% случаев, в то время как на 5 МЕ ППД для млекопитающих реакция интенсивностью 12,0 мм. и 33% реагирующих животных.

У животных сенсibilизированных *M. fortuitum* в дозе 10 мг. выявлена реакция только на КАМ, с интенсивностью 11,67 мм. в 100%. Использование двукратного введения микобактерий *M. intracellulatae* дозе 10 мг сопровождалась проявлением реакции на комплексный аллерген у всех экспериментальных животных, в свою очередь при применении туберкулина для млекопитающих характеризовалось реакционностью у 33% особей.

Также у морских свинок, иммунизированных микобактериями *M. scrofulaceum* кожная аллергическая реакция проявлялась, как в отношении КАМ, так и в отношении ППД для млекопитающих у всех животных.

При этом интенсивность кожной туберкулиновой реакции ГЗТ при применении двукратной дозы микобактерий 10 мг., в сравнении с использованием однократного введения 10 мг. была больше.

В группе животных, двукратно сенсibilизированных *M. intracellulatae*, в дозе 10 мг. регистрировалась аллергическая реакционность на комплексный туберкулин из атипичных микобактерий у всех животных с интенсивностью 17,5

мм., в то время как в отношении туберкулина ППД для млекопитающих в 67% и интенсивностью 9,5 мм. В группе животных сенсibilизированных микобактериями *M. scrofulaceum* двукратно; 100% особей характеризовались реакционностью с интенсивностью 19,5 мм.

Интенсивность реакции на ППД для млекопитающих составила 7,5 мм. при 100% реагировании. В группе морских свинок, сенсibilизированных двукратно *M. fortuitum* интенсивность реакции на КАМ составила 10,33 мм. при 100% реагировании. Аллергическая реакционность на дозу ППД для млекопитающих отсутствовала.

Сопоставление значений аллергической реакции на 10 ЕД КАМ, в группах животных двукратно сенсibilизированных нетуберкулёзными микобактериями в дозе 5 и 10 мг. соответственно, свидетельствовало о большей чувствительности и увеличенном проценте реагирующих животных, в сравнении с животными которым однократно вводили микобактерии. Выявленная зависимость предполагает возможность использования схемы двукратного введения микобактерий.

Результаты, полученные в предварительном исследовании, предполагают проведение дополнительных испытаний на большем количестве животных. При осуществлении исследования был использован вариант сенсibilизации морских свинок подкожно, микобактериями в дозе 5 мг.

Экспериментальные данные, полученные при оценке сенсibilизирующих свойств различных групп не туберкулёзных микобактерий, в дозе 5 мг. представлены в таблице 6.

Таблица 6 –Чувствительность и специфичность вариантов сенсibilизации морских свинок атипичными микобактериями в дозе 5 мг.

Параметры	Сенсibilизация микобактериями			
	<i>M. intracellulatae</i> (1 группам/св, n=10)		<i>M. scrofulaceum</i> (2 группам/св, n=10)	
	КАМ 10 ЕД	ППД 5 МЕ	КАМ 10 ЕД	ППД 5 МЕ
М±m,	11,9±0,41	0	16,1±0,72	9,15±1,06
Процент реагирующих животных	100	0	100	90
Параметры	Сенсibilизация микобактериями			
	<i>M. fortuitum</i> (3 группа м/св, n=10)		<i>M. bovis</i> (4 группа м/св, n=10)	
	КАМ 10 ЕД	ППД 5 МЕ	КАМ 10 ЕД	ППД 5 МЕ
М±m,	8±0,4	0	12,4±0,4	14,45±0,51
Процент реагирующих животных	100	0	100	100

Из представленных данных видно, что в первой группе морских свинок, сенсibilизированных *M. intracellulatae*, через 24 после введения аллергенов выявляется состояние ГЗТ на 10 ЕД КАМ- 11,9±0,41 мм. у всех животных, при отсутствии реакции на 5 МЕ ППД для млекопитающих.

Во второй группе животных, сенсibilизированных *M. scrofulaceum* реакция ГЗТ регистрируется реакция через 24 часа на 10 ЕД КАМ с интенсивностью 16,1±0,72 мм. и реакционностью на уровне 100%. Аллергическая реакция на 5 МЕ ППД для млекопитающих была выявлена в 90% случаях и интенсивностью реакции 9,15±1,06 мм. При этом интенсивность реакции на КАМ в сравнении с ППД для млекопитающих была достоверно больше.

В группе морских свинок, сенсibilизированных *M. fortuitum* в дозе 5 мг, на дозу 10 ЕД КАМ выявлена аллергическая реакция с интенсивностью 8±0,4 мм., в 100% и её отсутствие на дозу 5 МЕ ППД для млекопитающих.

В группе морских свинок, иммунизированных микобактериями *M. bovis* у всех животных выявлена аллергическая реакция на КАМ и ППД для млекопитающих с интенсивностью 12,4±0,4 мм., и 14,45±0,51 мм., соответственно. При этом, интенсивность реакции достоверно больше на дозу ППД для млекопитающих, чем на дозу КАМ, что свидетельствует об

эффективности и специфичности используемых дозировок аллергенов, при проведении подобных исследований.

Таким образом выявлено, что для сенсibilизации морских свинок атипичными микобактериями дозировка при подкожной инъекции должна быть не менее 5 мг. на животное. При этом двукратная инъекция атипичных микобактерий, в сравнении с однократной, в дозах 5 или 10 мг. на животное характеризуется большей чувствительностью.

## 4.2. Изучение факторов оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов, при разных дозировках

### 4.2.1. Определение эквивалентных оптимальных дозировок ППД туберкулина для млекопитающих

Изучение биологической активности микобактериальных аллергенов осуществляется с использованием нескольких доз испытуемого и нескольких доз контрольного препаратов [28, 29, 30]. Причем нормативными документами диапазон используемых дозировок не регламентируется.

В нормативных документах указано, что используемые дозировки должны обеспечивать линейность: доза- интенсивность кожной реакции ГЗТ [216].

Из этого следует, что не соответствие дозировок, используемых при оценке биологических параметров микобактериальных аллергенов, может являться причиной значимой погрешности. Учитывая изложенное, следующим этапом исследования было определение эквивалентных дозировок ППД для млекопитающих приемлемые для оценки биологической активности.

В исследованиях, представленных ранее, продемонстрировано, что для проведения сравнительных исследований биологической активности ППД для

млекопитающих оптимальным является вариант сенсibilизации морских свинок предполагающий внутрикожное введение живых авирулентных микобактерий. В связи, с чем исследования по определению оптимальных дозировок для оценки активности ППД для млекопитающих, были осуществлены с использованием варианта сенсibilизации морских свинок предполагающем внутрикожное введение микобактерий бычьего вида штамм БЦЖ в дозе 0,2 мг. При проведении исследования были использованы 3 группы морских свинок, в каждой из которых применяли неодинаковые дозировки туберкулина ППД для млекопитающих. Критерием оценки исследования служила интенсивность аллергической реакции ГЗТ, и процент реагирующих животных. В работе были использованы различные дозы туберкулина очищенного (ППД) для млекопитающих. Экспериментальные данные исследования представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Эквивалентность диапазона доз ППД для млекопитающих в группах животных, сенсibilизированных *M. bovis* штамм БЦЖ

Показатели	Дозы ППД туберкулина для млекопитающих МЕ					Сумма МЕ
	1000	125	25	5	1	
	Интенсивность и частота аллергических реакций					
Пять доз, группа 1 (n=10)						
М± m	22,10± 1,22	17,86± 2,08	14,42± 3,48	14,17± 1,76	-	1155
Процент реагирующих животных	100	78	67	33	-	
Четыре дозы, группа 2 (n=10)						
М± m	-	17,90± 1,58	15,30± 1,16	13,1± 1,5	-	155
Процент реагирующих животных	-	100	100	100	-	
Три дозы, группа 3 (n=10)						
М± m	-	-	18,39± 0,50	14,60± 0,43	9,56± 0,42	31
Процент реагирующих животных	-	-	100	100	100	

Из полученных данных видно, что в экспериментальных группах интенсивность и процент реагирующих животных на различные дозы различалась. В первой группе (суммарное значение МЕ -1155 МЕ), максимальная



интенсивность реакции ГЗТ выявлена на дозу 1000 МЕ при соответствии процента реагирующих животных на уровне 100% и минимальным значением кожной реакции ГЗТ на дозу 5 МЕ (процент реагирующих животных равен 33%), при отсутствии реакций на дозу 1 МЕ.

Во второй и третьей группах, при использовании доз в диапазоне от 125 МЕ до 1 МЕ, и в диапазоне от 25 МЕ до 1 МЕ выявлен дозо - зависимая закономерность с процентом реагирования животных на уровне 100.

Учитывая результаты исследования, полученные в первой и второй экспериментальных группах, таблицы 7 видно, что при оценке величины биологическая активность ППД для млекопитающих следует использовать антигенную нагрузку с суммарным значением активности менее 1155 МЕ.

Вместе с тем суммарное значение активности может быть более 155 МЕ. Кроме того, принимая во внимание результаты исследования, полученные в 3 группе (значение антигенной нагрузки на уровне 31 МЕ) указанная суммарная антигенная нагрузка может являться минимальной.

Вместе с тем определение параметра величина активности ППД для млекопитающих предполагает использование удвоенной антигенной нагрузки (удвоенного значения МЕ). Используя расчетные минимальное значение (31 МЕ), получаем, что диапазон доз может соответствовать  $(31 \times 2 = 62)$  -  $(155 \times 2 = 310)$ . Проверка расчетных значений была проведена с использованием одной серии аллергена для млекопитающих на животных двух групп иммунизированных микобактериями *M. bovis*, но с использованием различных дозировок. Таблица 7 демонстрируют, что суммарное значение доз может быть ниже 62 МЕ, а пограничные значения составляют 1-310 МЕ линейность в диапазоне 5-125 МЕ (группа 3), а также в диапазоне 1-25 МЕ (группа 2).

В серии предварительных исследований, проведенных на сенсibilизированных животных, было выявлено, что интервал между дозами ППД туберкулинов может соответствовать 2, 5, 10. При осуществлении данного исследования был использован интервал равный 5.

Принимая во внимание минимальное значение активности аллергена, соответствующее 1 МЕ способное выявить состояние ГЗТ у экспериментальных животных, и выбранный интервал используемые дозировки будут соответствовать следующим значениям: 1 МЕ; 5 МЕ; 25 МЕ (в первой группе животных).

Увеличение дозы ППД для млекопитающих с использованием пятикратного интервала будут соответствовать следующим значениям: 5 МЕ; 25 МЕ; 125 МЕ (во второй группе животных). Принимая во внимание пониженную антигенную нагрузку по МЕ (62 МЕ) в первой экспериментальной группе, последняя являлась контрольной.

При проведении данного исследования были оценены интенсивность кожной реакции ГЗТ на разные дозы аллергенов, процент реагирующих животных, доверительный интервал, биологическая активность, значения доверительного интервала (50-200%), а также биологической активности ( $R=1,0\pm 0,2$ ) позволили характеризовать сравниваемые группы. Результаты экспериментальных изысканий представлены в таблице 8.

Из полученных данных видно, что в исследуемых группах не имеется различия по биологической активности. Сопоставляя показатели активности, полученные в двух группах между собой, видно, что они соответствуют границам, установленным в соответствии формулы:  $R=100\pm 20\%$ .

Так в группе морских свинок, которым инъецировали пониженные дозировки исследуемого и контрольного препаратов: 25, 5 и 1 МЕ биологическая активность соответствовала  $9300 \text{ ME}/\text{cm}^3$ , при соответствии доверительного интервала 60%- 167%; в то время как в группе морских свинок, которым инъецировали повышенные дозировки исследуемого и контрольного препаратов: 125, 25 и 5 МЕ биологическая активность соответствовала  $9500 \text{ ME}/\text{cm}^3$ , при соответствии доверительного интервала 64%- 156%.

Кроме того, видно, что интенсивность кожной реакции ГЗТ характеризуется равнозначностью на следующие дозы 1 МЕ (пониженные дозы) и 5 МЕ (повышенные дозы); 5 МЕ (пониженные дозы) и 25 МЕ (повышенные дозы); 125

МЕ (пониженные дозы) и 25 МЕ (повышенные дозы) как на тестируемый препарат, так и на контрольный препараты.

Таблица 8 – Биологическая активность туберкулина очищенного ППД для млекопитающих с применением различных дозировок

Биологическая активность ППД для млекопитающих, морские свинки, сенсibilизированные микобактериями <i>M. bovis</i> , БЦЖ (пониженные дозы) (n=11), группа 1.						
Показатели	Испытуемая серия			Контрольная серия		
Доза, МЕ	25	5	1	25	5	1
<b>M±m</b>	19,05± 0,73	15,36± 0,48	12,86± 0,42	18,55± 0,75	15,86± 0,58	13,23± 0,42
Процент реагирующих животных	100	100	100	100	100	100
Доверительный интервал - 60%- 167%; Биологическая активность- 9300 МЕ/см <sup>3</sup> ; (суммарное значение активности - 62 МЕ)						
Биологическая активность ППД для млекопитающих, морские свинки, сенсibilизированные <i>M. bovis</i> , БЦЖ (повышенные дозы) (n=11), группа 2.						
Показатели	Испытуемая серия			Контрольная серия		
Доза, МЕ	125	25	5	125	25	5
<b>M±m</b>	18,86± 0,66	14,95± 0,60	11,91± 0,52	18,05± 0,44	15,09± 0,5	12,86± 0,36
Процент реагирующих животных	100	100	100	100	100	100
Доверительный интервал - 64%- 156%; Биологическая активность- 9500 МЕ/см <sup>3</sup> ; (суммарное значение активности - 310 МЕ)						

Таким образом, полученные экспериментальные данные демонстрируют, что эквивалентными дозами, для оценки биологической активности туберкулина, очищенного ППД для млекопитающих, являются 62 МЕ-310 МЕ (с учетом использования тестируемой и контрольной серии препарата). Вместе с тем для осуществления различных сравнительных исследований диапазон дозировок может соответствовать 1 -300 МЕ.

#### 4.2.2. Определение эквивалентных оптимальных дозировок ППД туберкулина для птиц

В исследованиях, проведенных ранее было выявлено, что оптимальный способ иммунизации животных микобактериями птичьего вида, сочетающим приемлемую чувствительность и специфичность предполагает подкожную инъекцию биомассы микобактерий *M. avium* в количестве 5 мг., который был использован для определения эквивалентных дозировок туберкулина, очищенного ППД для птиц. Определение оптимальных доз туберкулина осуществляли по интенсивности кожной туберкулиновой реакции ГЗТ, а также по проценту реагирующих животных. Результаты экспериментального исследования представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Эквивалентность диапазона доз ППД для птиц в группах морских свинок, сенсibilизированных *M. avium* штамм 22-82

оказатели	Дозы туберкулина очищенного ППД для птиц, МЕ					Сумма МЕ
	1000	125	25	5	1	
	Интенсивность и частота аллергических реакций					
Четыре дозы, группа 1 (n=10)						
М± m	20,67±1,42	13,58±0,42	7,0 ±2,28	0	-	1155 МЕ
Процент реагирующих животных	100	100	67	0	-	
Три дозы, группа 2 (n=10)						
М± m	-	18,0±0,5	14,61±0,59	11,39±0,41	-	155 МЕ
Процент реагирующих животных	-	100	100	100	-	
Три дозы, группа 3 (n=10)						
М± m	-	-	15,3± 0,63	12,27±0,48	10,2± 0,32	31 МЕ
Процент реагирующих животных	-	-	100	100	100	

Из полученных данных, выявлено, что в экспериментальных группах сенсibilизированных морских свинок интенсивность и процент реагирующих

животных были различными. Так в первой группе (суммарное значение МЕ 1155) выявлено, что интенсивность и частота реагирующих животных зависела от дозы: максимальным значением на дозу 1000 МЕ (процент реагирующих животных - 100) и интенсивностью  $20,67 \pm 1,42$ , минимальным значением на дозировку 25 МЕ (процент реагирующих животных - 67) и отсутствием реакции на дозу 5 МЕ. Во второй группе (суммарное значение МЕ -155) выявлено, что интенсивность кожной реакции ГЗТ также зависит от дозы: с максимальным значением на дозировку 125 МЕ, а минимальным на дозу 5 МЕ и средним значением интенсивности на дозу 25 МЕ (процент реагирующих животных на уровне 100, во всех экспериментальных группах). Учитывая полученные результаты исследования, очевидно, что при оценке биологической активности ППД туберкулина для птиц суммарное значение активности должно быть менее 1155 МЕ, но может быть выше 155 МЕ.

Сопоставляя результаты исследований, полученные в различных группах видно, что в первой группе реакция ГЗТ на дозу 5 МЕ не выявлена, в то время как в остальных экспериментальных группах использование дозы туберкулина 5 МЕ сопровождается развитием реакции.

При оценке биологической активности ППД для птиц предусмотрено использование удвоенной антигенной нагрузки, обусловленное как испытуемым, так и контрольным образцами. Принимая это во внимание, получаем следующее выражение:  $(31 \times 2 = 62 \text{ МЕ}) - (155 \times 2 = 310 \text{ МЕ})$ .

Последующая оценка расчетных доз была осуществлена с использованием одного образца аллергена для птиц в экспериментальных группах иммунизированных микобактериями *M. avium*, с применением различных доз. При осуществлении исследований между дозами был использован пятикратный интервал. Таким образом, в первой группе были использованы дозы: 25 МЕ; 5 МЕ; 1 МЕ, а во второй группе: 125 МЕ; 25 МЕ; 5 МЕ. Результаты исследования представлены в таблице 10.

Таблица 10 –Биологическая активность ППД для птиц при использовании различного диапазона доз

Морские свинки, сенсibilизированные <i>M. avium</i> (Пониженные дозы туберкулина для птиц) (n=10)						
Показатели	Испытуемая серия			Контрольная серия		
Доза, МЕ	25	5	1	25	5	1
<b>M±m</b>	17,35± 0,43	13,45± 0,42	11,0± 0,29	16,25± 0,38	13,5± 0,67	10,95± 0,38
Процент реагирующих животных	100	100	100	100	100	100
Доверительный интервал - 68%-147%; Биологическая активность- 61230 МЕ/мг; (суммарное значение активности - 62 МЕ)						
Морские свинки, сенсibilизированные <i>M. avium</i> (Повышенные дозы туберкулина для птиц) (n=9)						
Показатели	Испытуемая серия			Контрольная серия		
Доза, МЕ	125	25	5	125	25	5
<b>M±m</b>	16,56± 0,44	14,33± 0,33	10,39± 0,46	16,61± 0,39	12,67± 0,46	11,17± 0,76
Процент реагирующих животных	100	100	100	100	100	100
Доверительный интервал - 65%-154%; Биологическая активность- 58326 МЕ/мг; (суммарное значение активности - 310 МЕ)						

Из представленных экспериментальных данных видно, что биологическая активность ППД для птиц, при использовании пониженных доз: 25 МЕ; 5 МЕ и 1 МЕ соответствует значению 61230 МЕ, а доверительный интервал 68-147%, в то время как при использовании повышенных доз туберкулина для птиц: 125 МЕ; 25 МЕ; 5 МЕ характеризовалось активностью 58326 МЕ, доверительный интервал соответствует 65-154%. Сопоставляя показатели активности, полученные в двух группах между собой, видно, что они соответствуют границам, установленным в соответствии формулы:  $R=100\pm 20\%$ .

Также выявлена закономерность: интенсивность кожной реакции ГЗТ характеризуется эквивалентностью на дозу 5 МЕ (повышенные дозы) и 1 МЕ (пониженные дозы), аналогично и дозировки 25 МЕ и 5 МЕ; 125 МЕ и 25 МЕ.

В целом результаты исследования предполагают, что эквивалентными для определения иммунобиологических параметров ППД для птиц являются

дозировки 62 МЕ-310 МЕ (с учетом использования тестируемой и контрольной серии препарата). Вместе с тем для осуществления различных сравнительных исследований диапазон дозировок может соответствовать 1 -300 МЕ.

#### 4.2.3. Определение эквивалентных оптимальных дозировок КАМ

Сравнительные исследования эффективности вариантов сенсibilизации морских свинок нетуберкулёзными микобактериями убедительно продемонстрировали целесообразность использования сенсibilизирующей дозировки пять и более мг. на одну голову.

Известно, что оценка активности КАМ проводится на сенсibilизации морских свинок смесью микобактерий, из которых приготовлен КАМ. Например, при использовании бивалентного КАМ необходимо использовать два вида микобактерий, из которых приготовлен препарат.

Предварительно проведенные исследования продемонстрировали, что для этого может быть использовано совместное введение микобактерий в дозе  $\frac{1}{2}$  каждого вида по отношению принятой оптимальной дозы, то есть 2,5 мг. *M. scrofulaceum* и 2,5 мг. *M. intracellulerae* подкожно. Указанный вариант был использован для определения эквивалентных дозировок КАМ. В исследовании использованы различные дозы КАМ, интервал между дозами соответствовал пяти. Результаты экспериментального исследования изложены в таблице 11.

Из полученных данных видно, что в опытных группах интенсивность и частота кожной аллергической реакции ГЗТ были различными. Так в первой экспериментальной группе, при использовании пяти доз, антигенная суммарная нагрузка составила 1155 МЕ, процент реагирования на дозы 1000 ЕД; 125 ЕД; 25 ЕД соответствовали 100, в то время как на дозу 5 ЕД, процент реагирования равнялся 60. во второй группе при использовании трёх доз: 125 ЕД; 25 ЕД; 5 ЕД, а также в третьей группе с использованием 25 ЕД; 5 ЕД; 1 ЕД реакции регистрировались в 100% случаев.

Таблица 11 – Эквивалентность диапазона доз КАМ в группах морских свинок сенсibilизированных смесью микобактерий

*M. scrofulaceum* и *M. intracellulareae*

Показатели	Дозы аллергена КАМ, ЕД					Сумма ЕД
	1000	125	25	5	1	
	Интенсивность и частота аллергических реакций					
Пять доз, группа 1 (n=10)						
М± m	17,20±1,41	15,20±1,08	10,60±0,87	7,83±0,68	-	1155 ЕД
Процент реагирующих животных	100	100	100	60	-	
Три дозы, группа 2 (n=9)						
М± m	-	15,3±0,39	11,65±0,32	9,55±0,27	-	155 ЕД
Процент реагирующих животных	-	100	100	100	-	
Три дозы, группа 3 (n=10)						
М± m	-	-	16,86±0,56	15,5±0,5	11,77±0,57	31 ЕД
Процент реагирующих животных	-	-	100	100	100	

Учитывая результаты исследования, очевидно, что не следует использовать при оценке биологической активности КАМ суммарно антигенную нагрузку 1155 МЕ и более. В то же время суммарное значение активности может превышать 155 ЕД. Кроме того результаты исследований, полученные в третьей группе животных, позволяют использовать суммарную нагрузку на уровне 31 ЕД.

Следующим этапом исследования была оценка расчетных доз КАМ. Исследования проведены в двух группах морских свинок. Животным первой группы инъецировали: 25 ЕД; 5 ЕД и 1 ЕД как испытуемой, так и контрольной серии.

Животным второй группы инъецировали: 125 ЕД; 25 ЕД и 5 ЕД, как испытуемой, так и контрольной серии. Результаты экспериментального исследования изложены в таблице 12.



Таблица 12 – Биологическая активность КАМ при использовании различного диапазона доз на морских свинках сенсibilизированных смесью микобактерий *M. scrofulaceum* и *M. intracellulerae*

Биологическая активность КАМ (пониженные дозы), морские свинки, сенсibilизированные смесью атипичных микобактерий (n=10)						
Показатели	Испытуемая серия			Контрольная серия		
Доза, ЕД	25	5	1	25	5	1
<b>M±m</b>	16,31± 0,44	13,50± 0,63	10,20± 0,73	16,40± 0,53	12,9± 0,29	10,70± 0,7
Процент реагирующих животных	100	100	100	100	100	100
Доверительный интервал - 79%- 127%; Биологическая активность- 6000 ЕД/см <sup>3</sup> ; (суммарное значение активности – 62 ЕД)						
Биологическая активность КАМ (повышенные дозы), морские свинки, сенсibilизированные смесью атипичных микобактерий (n=10)						
Показатели	Испытуемая серия			Контрольная серия		
Доза, ЕД	125	25	5	125	25	5
<b>M±m</b>	17,0± 0,24	12,94± 0,21	10,06± 0,27	17,33± 0,29	12,5± 0,49	10,78± 0,31
Процент реагирующих животных	100	100	100	100	100	100
Доверительный интервал - 61%- 164%; Биологическая активность- 6700 МЕ/см <sup>3</sup> ; (суммарное значение активности – 310 ЕД)						

Из полученных экспериментальных данных видно, что биологическая активность КАМ при использовании пониженных доз: 25 ЕД; 5 ЕД; и 1 ЕД соответствует значению 6700 ЕД, а доверительный интервал равен 61-164%. Результат исследования величины биологической активности, полученный в группе животных с использованием повышенных доз: 125 ЕД; 25 ЕД; и 5 ЕД равен значению 6000 ЕД, а доверительный интервал соответствует 79-127%, что также соответствует значению  $R=100\pm 20\%$ .

Таким образом экспериментальные данные полученные на морских свинках, сенсibilизированных нетуберкулёзными микобактериями свидетельствуют, что при определении иммунобиологических параметров КАМ эквивалентными являются дозировки 62 ЕД- 310 ЕД. В тоже время для

осуществления экспериментальных исследований диапазон дозировок может соответствовать 1 -300 МЕ.

#### 4.3. Совершенствование биологической модели микобактериальных инфекций животных

##### 4.3.1. Оценка биологической активности ППД туберкулина для млекопитающих на различных биологических моделях

Биологический эквивалент активности туберкулина для млекопитающих, в соответствии руководства «(OIE) *Manual of standards for Diagnostic Tests and Vaccines*» и «ГОСТ 16739-88» может быть оценен и на морских свинках, сенсibilизированных микобактериями *M. bovis*, и на инфицированном микобактериями туберкулёза бычьего вида крупном рогатом скоте [12, 31, 320]. В свою очередь в доступной литературе эффективность вариантов не определена. Кроме того одним из этапов оценки биологической активности туберкулинов являются статистический расчет результатов оценки интенсивности кожной туберкулиновой реакции. Вместе с тем в соответствии выше упомянутой нормативной документацией предусмотрены различия в методиках расчета биологической активности ППД туберкулина. Так метод ГОСТ 16739-88 предполагает пропорциональную оценку активности испытуемого туберкулина, в сравнении с контрольным аллергеном. В то время как метод МЭБ предполагает расчет логарифмической зависимости.

Учитывая выше изложенные следующим этапом исследования, был сравнительный анализ результатов математического расчета параметра биологическая активность согласно методик «(OIE) *Manual of standards for Diagnostic Tests and Vaccines*» и «ГОСТ 16739-88».

Для осуществления исследования были использованы варианты туберкулина для млекопитающих с неодинаковым содержанием белка, в

интервале: от 0,5 мг/см<sup>3</sup> до 1,0 мг/см<sup>3</sup>. Оценку активности проводили в группах морских свинок сенсibilизированных авирулентными микобактериями бычьего вида. Результаты экспериментального исследования представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Результаты оценки параметра биологическая активность туберкулина для млекопитающих в соответствии методик ГОСТ и МЭБ

Номер образца ППД для млекопитающих	1	2	3	4	5	6	7
Активность по ГОСТ 16739-88 МЕ/см <sup>3</sup>	9300	9400	9400	9600	9700	10000	10500
Активность по МЭБ МЕ/см <sup>3</sup>	5500	6300	6800	7000	8100	9700	14300
Доверительный интервал	58%-173%	63%-158%	72%-139%	55%-183%	63%-159%	61%-164%	71%-142%
Количество животных	8	8	8	12	9	10	8
Концентрация мг/см <sup>3</sup>	0,5	0,6	0,65	0,69	0,8	0,95	1,0

Из представленного табличного материала видно, что результаты активности ППД для млекопитающих в соответствии методик ГОСТ отличаются от результатов методики МЭБ. Наглядно результат сравнения двух методик расчета активности представлен на рисунке 1.

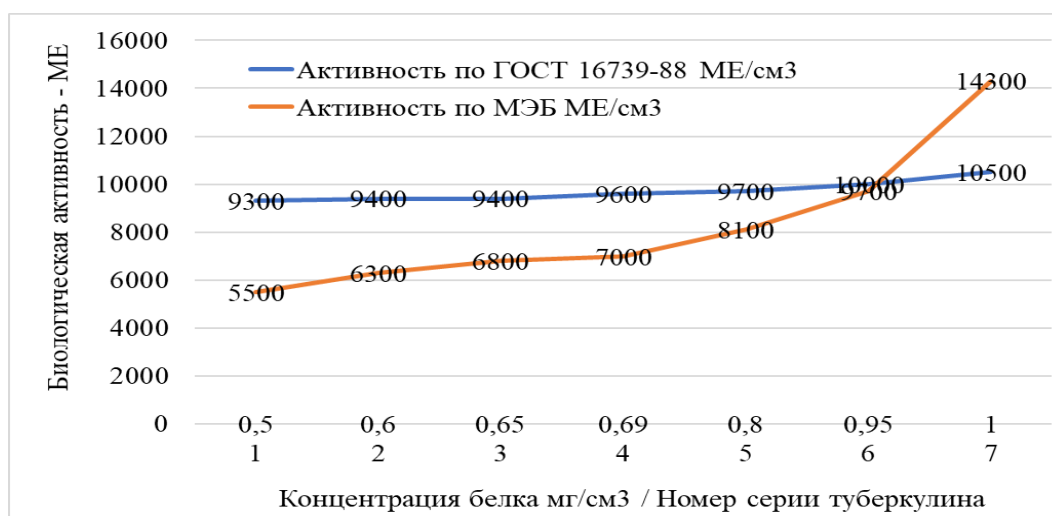


Рисунок 1 – Величина биологической активности ППД для млекопитающих, рассчитанная в соответствии ГОСТ16739-88 и методике МЭБ

Так в соответствии методике МЭБ значения активности ППД для млекопитающих характеризуются зависимостью биологической активности и концентрации белка. Таким образом, образцы 1 и 2 не соответствуют требованиям по биологической активности. Вместе с тем использование при осуществлении

расчета в соответствии методики изложенной в ГОСТ 16739-88 образцы 1 и 2 характеризуется как активные, пригодные для практического применения.

Так в соответствии современных требований активность ППД для млекопитающих должна соответствовать диапазону 6600-15000 МЕ/см<sup>3</sup>.

В доступной литературе не определена эффективность применяемых животных моделей (лабораторных животных иммунизированных микобактериями бычьего вида и крупном рогатом скоте, естественно инфицированном микобактериями туберкулёза бычьего вида) для оценки критерия величина биологической активности туберкулина очищенного ППД для млекопитающих. В связи, с чем актуальным является сравнительный анализ параметров биологической активности туберкулина для млекопитающих на разных биологических моделях, что составило следующий этап исследования.

В лабораторных условиях были изготовлены две серии туберкулина очищенного (ППД) для млекопитающих, с различной концентрацией белка: 0,9 мг/см<sup>3</sup> и 0,6 мг/см<sup>3</sup>. Указанный подход обусловлен тем, что биологическая активность аллергенов характеризуется положительной зависимостью с концентрацией белка, как было показано ранее. Предположительная активность туберкулинов, будут соответствовать 9000 МЕ и 6000 МЕ соответственно. Вместе с тем как показывает практика предполагаемая, и фактическая биологическая активность могут различаться.

Указанные серии по параметру биологическая активность были протестированы на морских свинках, сенсibilизированных *M. bovis*, штамм БЦЖ. Результаты оценки биологической активности представлены в таблице 14.

Из полученных результатов исследования видно, что серии препарата по биологической активности значительно различаются. Так первая серия характеризовалась биологической активностью на уровне 8470 МЕ/см<sup>3</sup> и соответствовала требованиям МЭБ (6600-15000 МЕ/см<sup>3</sup>,  $p=0,95$ ). Вместе с тем активность второй серии была ниже установленных пределов МЭБ и соответствовала 4070 МЕ/см<sup>3</sup>,  $p=0,95$ .

Таблица 14 – Величина биологической активности туберкулина для млекопитающих на сенсibilизированных *M. bovis* штамм БЦЖ морских свинок

Показатели	ППД туберкулин для млекопитающих							
	Серия 1				Серия 2			
n	10				10			
Препарат	Испытуемая серия		Контрольная серия		Испытуемая серия		Контрольная серия	
Дозы, МЕ	20	2	20	2	20	2	20	2
M±m	21,13 ±1,02	13,38 ±1,15	21,81 ±1,19	14,44 ±0,94	17,5 ±0,84	10,92 ±0,49	19,50 ±0,51	14,08 ±1,01
Содержание белка в растворе туберкулина	0,9 мг/см <sup>3</sup>				0,6 мг/см <sup>3</sup>			
Биологическая активность (6600-15000 МЕ)	8470 МЕ/см <sup>3</sup>				4070 МЕ/см <sup>3</sup>			
Доверительный интервал 50 % -200 % (p=0,95).	52%-192%				58%-173%			

Следующим этапом исследования была оценка биологической активности образцов ППД туберкулина для млекопитающих на естественно инфицированном микобактериями туберкулёза бычьего вида крупном рогатом скоте. Исследования на больном туберкулёзом крупном рогатом скоте были осуществлены в туберкулёзных изоляторах Волгоградской области.

Расчетные значения оценки биологической активности туберкулина для млекопитающих на инфицированных микобактериями туберкулёза бычьего вида коровах отображены в таблице 15.

Таблица 15– Биологическая активность туберкулина для млекопитающих на крупном рогатом скоте, инфицированном микобактериями *M. bovis*

Показатели	ППД туберкулин для млекопитающих							
	Серия 1				Серия 2			
n	15				8			
Препарат	Испытуемая серия		Контрольная серия		Испытуемая серия		Контрольная серия	
Дозы, МЕ	2000	400	2000	400	2000	400	2000	400
M±m	10,43 ±1,13	5,67 ±0,67	11,87 ±1,19	5,73 ±0,64	10,50 ±1,05	5,38 ±0,78	13,25 ±2,05	6,50 ±1,24
Биологическая активность (6600-15000 МЕ)	8013 МЕ/см <sup>3</sup>				5914 МЕ/см <sup>3</sup>			
Доверительный интервал 50 % -200 % (p=0,95).	58%-170%				50%-200%			

Из данных таблицы 15 видно, что биологическая активность тестируемых серий ППД туберкулина различна. Так при определении биологической активности первой серии видно, получено значение - 8013 МЕ/см<sup>3</sup>, что соответствует международным требованиям (6600-15000 МЕ, при  $p=0,95$ ). В то же время значение активности второй серии равное 5914 МЕ/см<sup>3</sup> не соответствует международным требованиям.

Оценка параметра биологическая активность образцов туберкулина для млекопитающих с различной концентрацией белка на сенсibilизированных микобактериями *M. bovis* штамм БЦЖ морских свинок и крупном рогатом скоте, инфицированном микобактериями туберкулёза бычьего вида, демонстрирует различие.

Сравнительные исследования были проведены с использованием рекомендованной статистической зависимости формуле:  $R=1,0\pm 0,2$  которая при процентном выражении представляет:  $R=100\%\pm 20\%$ , или активность должна соответствовать от 80% до 120%.

В соответствии нормативной документации МЭБ и ВОЗ установлена, сопоставимость биологической активности первой серии препарата 8470 МЕ (морские свинки)- 100%, 8013 МЕ (крупный рогатый скот) - х. Отсюда  $x=(8013 \times 100)/8470=94\%$ . В то же время биологическая активность второй серии туберкулина на иммунизированных морских свинок разница со значением на крупном рогатом скоте, инфицированном микобактериями туберкулёза 4070 МЕ (морские свинки)- 100%, 5914 МЕ (крупный рогатый скот)-х. Отсюда  $x=(5914 \times 100)/4070=145,3\%$ , в соответствии указанной формулы результаты не равнозначны.

Принимая во внимание результаты предварительных исследований [92, 271] демонстрирующие меньшую вариабельность туберкулиновой реакции у морских свинок, в сравнении с инфицированным микобактериями туберкулёза крупном рогатом скотом, лабораторные животные являются наиболее адекватной биологической моделью при оценке биологических характеристик туберкулиновых аллергенов.

Таким образом, сопоставление методик расчета активности ППД для млекопитающих в соответствии нормативных документов РФ, в сравнении с МЭБ продемонстрировали различия. Методика расчета биологической активности МЭБ является предпочтительной, так как характеризует зависимость доза-интенсивность кожной туберкулиновой реакции. Также выявлено, что оценку параметра активность туберкулина для млекопитающих целесообразно проводить на лабораторной модели – сенсibilизированных микобактериями морских свинок. Оценка активности ППД туберкулина для млекопитающих на инфицированном крупном рогатом скоте может быть только ориентировочной.

#### 4.3.2. Разработка практических подходов для формирования групп морских свинок при оценке иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов

Использование лабораторных животных с близкой иммунологической реактивностью, то есть животных особей с реакцией доза аллергена - величина кожной реакции ГЗТ является основным условием для получения достоверных результатов, при определении биологических параметров микобактериальных аллергенов [22, 216].

Формирование групп животных с близкой иммунологической реактивностью возможно несколькими путями. Так одним из вариантов является применение линейных животных [33]. Другим вариантом является использование животных, стандартизированных по физиологическим параметрам, например полу, массе тела, возрасту, уровню общей неспецифической реактивности организма [91]. Вместе с тем наиболее часто используется сочетание нескольких параметров, таких как, генетической идентичности и физиологических (пола, возраста и других).

К настоящему времени выведены несколько инбредных линий морских свинок. В мировой практике при оценке биологических характеристик

микобактериальных аллергенов используется линия *Hartley*. Анализ коммерческих питомников лабораторных животных России свидетельствует об отсутствии подобных линий и соответственно невозможности их использования.

В Российской Федерации оценка биологических характеристик микобактериальных аллергенов осуществляется с использованием рандобредных морских свинок, подобранных в группы по полу, массе тела, масти и сенсibilизированных соответствующими видами микобактерий [31, 62, 204].

В свою очередь, согласно требований документации РФ, регламентирующей контроль качества микобактериальных аллергенов (ГОСТ 16739-88), при проведении исследований используются животные без учета иммунологического статуса. Таким образом, в сформированной группе животных могут быть особи с различной иммунологической реактивностью, что может увеличить погрешность тестов. В свою очередь использование соответствующих критериев, для оценки иммунологического статуса организма морских свинок позволит снизить погрешность, при оценке биологических критериев микобактериальных аллергенов.

В медицинской практике используется клинический критерий характеризующий предрасположенность организма человека к туберкулёзупоствакцинный рубчик в месте инъекции вакцины БЦЖ [72, 87]. Указанный критерий может быть использован при формировании групп морских свинок используемых для оценки биологических критериев микобактериальных туберкулинов.

Также в медицинской практике критерием оценки развития туберкулёзной инфекции является масса тела [87].

Изучить практическую значимость указанных критериев на морских свинках возможно путём оценки взаимосвязей (корреляции) [70].

В связи с этим первоначальным этапом исследования было определение корреляционной зависимости у морских свинок, сенсibilизированных микобактериями: между размером воспаления в месте введения *M. bovis* штамм БЦЖ и интенсивностью ГЗТ на дозу туберкулина, а также массой тела.



В свою очередь с целью практического использования выявленной закономерности исследования целесообразно проводить в сравнении с гетерологичным туберкулином (и таким образом оценить специфичность выбранного критерия). Учитывая антигенный состав туберкулинами характеризующиеся гетерологичностью в отношении морских свинок иммунизированных микобактериями бычьего вида являются комплексный аллерген из атипичных микобактерий, а также аллерген для птиц [113].

Принимая во внимание более широкий спектр антигенов комплексного аллергена из атипичных микобактерий (включает антигены *M. scrofulaceum* и *M. intracellulerae*) [221], при высокой степени гомологии *M. intracellulerae* и *M. avium* [136], использование КАМ более выгодно в сравнении с ППД туберкулином для птиц.

При осуществлении исследования была сформирована группа из самок морских свинок (20 голов), альбиносов, 12 месячного возраста. Животные внутрикожным способом инъекции были иммунизированы *M. bovis* штамм БЦЖ, в дозе 0,2 мг. Через 30 суток от момента сенсибилизации животных использовали в исследованиях с использованием КАМ, в дозе 10 ЕД и туберкулин для млекопитающих, в дозе 5 МЕ (данные дозы аллергенов рекомендованы для изучения сенсибилизирующих свойств атипичных микобактерий в соответствии «Наставления по диагностике туберкулёза животных», 2002 год). Через 24 часа, после введения разведений туберкулиновых аллергенов, оценивали аллергическую реакционность на комплексный аллерген КАМ (первый ряд переменных); аллергическую реакционность в месте внутрикожного введения ППД для млекопитающих (второй ряд переменных); размеры воспалительной реакции в месте введения *M. bovis* штамм БЦЖ (третий ряд переменных), также была оценена масса тела животных (четвёртый ряд переменных) и рассчитана корреляционная зависимость, между переменными. Полученные данные переменных значений представлены в таблице 16. Результаты корреляционного анализа представлены в таблице 17.

Таблица 16 – Зависимость критериев формирования групп морских свинок

Номер морской свинки	Критерий знака КАМ-ППД для млекопитающих	Размер воспаления в месте введения КАМ (10ЕД), мм.	Размер воспаления в месте введения ППД для млекопитающих (5 МЕ), мм.	Размер воспаления в месте введения микобактерий <i>M. bovis</i> БЦЖ, мм.	Масса, гр.
	-	1	2	3	
	Ряды переменных				
1	<	13,0	17,0	11,0	600
2	<	10,0	15,5	8,5	500
3	<	12,5	17,0	11,0	650
4	<	12,0	22,5	16,0	450
5	<	11,5	22,5	13,5	650
6	<	13,5	18,5	14,0	626
7	<	10,0	18,5	12,5	594
8	<	14,0	18,0	14,0	600
9	<	12,5	18,0	15,5	626
10	<	12,5	17,5	8,5	594
11	<	11,5	19,0	13,5	600
12	<	16,0	20,0	13,5	650
13	<	15,0	18,0	12,5	450
14	<	8,5	18,0	12,5	550
15	<	10,5	21,5	13,0	650
16	<	15,5	20,0	15,5	580
17	<	14,0	19,5	12,5	600
18	<	13,5	17,0	15,5	550
19	<	15,0	17,0	11,5	580
20	<	15,0	17,0	10,0	650
<b>M± m</b>	-	12,8±0,46	18,6± 0,43	12,73± 0,49	587,5±13,73

Таблица 17 – Расчетные данные корреляционного анализа

Вариант корреляции	Корреляционный анализ	Значения
1	1-3	0,16
2	2-3	<b>0,57*</b>
3	1-4	0,11
4	2-4	0,08
5	3-4	-0,08

Примечание: \*статистически значимое значение ( $p \leq 0,01$ )

Проведенный анализ продемонстрировал, что зависимость между исследованными критериями различна.

Результаты корреляционного анализа продемонстрировали отсутствие статистически значимых значений в 1, 3, 4 и 5 вариантах. Вместе с тем во втором варианте: между размером кожной воспалительной реакции ГЗТ на ППД для млекопитающих и размером воспалительной реакции в месте введения

микобактерий *M. bovis* БЦЖ выявлена положительная корреляционная зависимость, соответствующая 0,57\* (статистически значимое значение на уровне значение ( $p \leq 0,01$ ). Полученная зависимость предполагает, что при развитии более интенсивного воспаления в месте введения микобактерий бычьего вида развивается более интенсивная аллергическая туберкулиновая реакция в месте инъекции туберкулина для млекопитающих. Кроме того сниженная зависимость между гетерологичным туберкулином и остальными показателями характеризует изучаемый критерий (между размером воспаления в месте введения *M. bovis* и интенсивностью ГЗТ на туберкулин для млекопитающих) как высокоспецифичный.

Цифровое значение, отображающее зависимость между воспалением в месте внутрикожной инъекции микобактерий бычьего вида и значением аллергической реакции в месте внутрикожной инъекции туберкулина для млекопитающих выявленная на морских свинках соотносится с результатами исследования, полученные на людях, и по-видимому, носит общебиологическую закономерность [72, 87]. Выявленная зависимость может быть использована для формирования групп животных для последующего изучения биологических параметров микобактериальных аллергенов.

Для этого был использован статистический метод формирования значений воспалительного процесса, в месте внутрикожного введения микобактерий бычьего вида (построение вариационных рядов), по интервалам. Для этого была использована группа морских свинок 12 месячного возраста (самки) в количестве 100 голов внутрикожно сенсibilизированных *M. bovis* штамм БЦЖ в дозе 0,2 мг. Через 30 суток, после сенсibilизации морских свинок измерены размеры воспалительной реакции в месте введения микобактерий и рассчитаны вариационные ряды. Результаты представлены в таблице 18.

Таблица 18 –Интервалы воспалительной реакции  
на внутрикожное введение *M. bovis* морских свинок

Номер интервала	Интервалы воспалительной реакции на введение <i>M. bovis</i> (мм.)	Частота интервала (f)
1	10,0-10,5	0,1
2	11,0-12,5	0,2
3	13,0-13,5	0,4
4	14,0-15,5	0,2
5	16,0-16,5	0,1

Проведенный статистический анализ с учетом крайних значений аллергической реакции (минимальной и максимальной) позволил сформировать пять интервалов, характеризующиеся неодинаковой частотой. Так максимальная частота соответствовала 0,4 (номер 3) интервал 13,0-13,5 мм., а минимальная частота соответствовала 0,1 (номер 1 и 5) интервалы соответственно 10,0-10,5 и 16,0-16,5 мм. Представленные табличные интервалы позволяют формировать экспериментальные группы лабораторных животных по интенсивности воспалительной реакции в месте введения микобактерий бычьего вида.

Расчет необходимого числа экспериментальных животных необходимого интервала, можно определить, как отношение числа животных необходимое для осуществления исследования делённое на частоту расчетного интервала (табличное значение).

Например, для осуществления исследования требуется 12 голов морских свинок, характеризующиеся интенсивностью воспалительной реакции третьего интервала (табличное значение), получаем  $12/0,4=30$  общего числа особей необходимое для сенсibilизации. С учетом расчетного критерия из этих особей выберем 12.

Последующие исследования подтвердили правильность предложенного подхода. Для этого было сформировано две экспериментальные группы. Первую группу морских свинок, формировали, используя стандартный подход, сенсibilизировали авирулентными микобактериями бычьего вида, штамм БЦЖ. Вторую группу морских свинок (в количестве 12 голов) формировали

предложенным способом. Для сенсibilизации использовали общее количество морских свинок равное тридцати (формирование по таблице, третий интервал 13,0-13,5 мм.).

После осуществления всех предварительных процедур и формирования двух равнозначных групп, осуществляли тестирование с использованием нескольких разведений туберкулина очищенного ППД для млекопитающих. После развития максимальной интенсивности кожной туберкулиновой реакции (через 24 часа) осуществляли статистический анализ, резюмированный в таблице 19.

Из полученных данных видно, что в группе морских свинок, сформированных стандартным способом коэффициент вариации на дозы 25, 5 и 1 МЕ ППД туберкулина для млекопитающих соответствует среднему уровню ( $V=11-25\%$ ), и превышает аналогичные значения параллельной группы животных, сформированных по размеру воспалительной реакции, в месте введения *M. bovis* (варьирование ниже среднего уровня:  $V<10\%$ ).

Таблица 19 – Вариация туберкулиновой реакции в группах морских свинок, сенсibilизированных *M. bovis* БЦЖ и сформированных разными способами

<b>Группа морских свинок, сформированная стандартным способом, n = 12</b>				
Показатели	Дозы ППД для млекопитающих			Сумма ГЗТ на ППД туберкулин
	25МЕ	5МЕ	1МЕ	
$M\pm m$	18±0,60	14,83±0,49	11,58±0,57	44,42±1,56
<b>V</b>	11,61	11,44	16,95	12
<b>Группа морских свинок, сформированная по размеру воспалительной реакции на введение <i>M. bovis</i>, n = 12</b>				
Показатели	Дозы ППД для млекопитающих			Сумма ГЗТ на ППД туберкулин
	25МЕ	5МЕ	1МЕ	
$M\pm m$	17,46±0,42	15,29±0,30	11,63±0,31	44,38±0,32
<b>V</b>	8,41	6,75	9,19	2,5

Таким образом, разработан подход для формирования групп морских свинок с близкой иммунологической реактивностью для изучения иммунобиологических параметров туберкулиновых аллергенов.

#### 4.3.3. Определение оптимального времени учета кожной реакции ГЗТ при постановке туберкулинового теста у морских свинок

Исследованиями по оценке оптимального времени учета кожной туберкулиновой реакции ГЗТ у различных видов животных продемонстрировано, что максимальная интенсивность развивается через различные промежутки времени. Так, у крупного рогатого скота, инфицированного микобактериями туберкулёза, максимальная интенсивность кожной туберкулиновой реакции регистрируется через 72 часа, после введения туберкулина очищенного (ППД) для млекопитающих. У мелкого рогатого скота максимальная интенсивность кожной туберкулиновой реакции определяется спустя 48 часов, после инъекции туберкулина [53]. У лабораторных животных (морские свинки), максимальная интенсивность кожной туберкулиновой реакции регистрируется в период 24-48 часов. При этом согласно одних литературных источников аллергическую реакцию следует оценивать через 24 часа, после введения разведений аллергена (-ов) [216]; а согласно других источников учет реакции следует проводить через 24 и 48 часов [113]. Предполагается, что не одинаковый интервал от момента введения туберкулинов до учета аллергической реакции может являться причиной погрешностей, при оценке как биологических критериев микобактериальных аллергенов, так и иммунологической реактивности при осуществлении различных сравнительных исследованиях на морских свинках. Учитывая изложенное следующим этапом исследования было определение оптимального времени учета кожной реакции ГЗТ на различные микобактериальные аллергены у морских свинок, сенсibilизированных не одинаковыми видами микобактерий.

Исследования были проведены на морских свинках представленные в три группы: животные первой группы инъецировали авирулентные микобактерии бычьего вида; особям второй группы инъецировали микобактерии птичьего вида; морские свинки третьей группы были сенсibilизированы смесью атипичных микобактерий: *M. intracellulae* штамм *N-13C* и *M. scrofulaceum* штамм *S-12*. Оценка результатов исследования осуществлялась по интенсивности реакции, проценту реагирующих животных, вариации туберкулиновой реакции. Через 30 дней, после сенсibilизации морских свинок инъецировали гомологичные туберкулины. После инъекции туберкулинов был проведён учет реакций, с интервалом 24 часа трижды.

Опыты по оценке развития состояния гиперчувствительности на иммунизированных авирулентными микобактериями морских свинок осуществляли с использованием двух дозировок туберкулина для млекопитающих: 5 и 1 МЕ. Опыты по оценке формирования гиперчувствительности замедленного типа на морских свинок иммунизированных патогенными микобактериями птичьего вида проведены с применением двух дозировок птичьего туберкулина: 100 и 10 МЕ. Исследования по оценке формирования повышенной чувствительности замедленного типа на морских свинок сенсibilизированных микобактериальной смесью атипичных микобактерий проведены с использованием очищенного аллергена КАМ с использованием доз: 125 и 25 ЕД. Результаты исследования представлены в таблице 20.

Сравнительный анализ полученных результатов исследования на различных группах морских свинок, сенсibilизированных разными видами микобактерий, продемонстрировал, что во временной период 24- 72 часа, после инъекции разведений микобактериальных аллергенов регистрируется изменение интенсивности кожной туберкулиновой реакции.

Выявлено, что максимальная интенсивность кожной туберкулиновой реакции ГЗТ, среди исследуемых групп морских свинок иммунизированных

различными микобактериями, регистрируется через 24 часа, после введения разведений микобактериальных аллергенов.

Таблица 20 –Интенсивность кожной туберкулиновой реакции ГЗТ на различные дозы туберкулиновых аллергенов, через различные временные промежутки

Показатели	ППД туберкулин для млекопитающих		ППД туберкулин для птиц		КАМ	
	Морские свинки сенсibilизированы <i>M.bovis</i>		Морские свинки сенсibilизированы <i>M.avium</i>		Морские свинки сенсibilизированы <i>M. scrofulaceum</i> и <i>M. intracellulerae</i>	
	5 ME	1 ME	100 ME	10 ME	125 ЕД	125 ЕД
<b>Учет реакции через 24 часа, после инъекции</b>						
<b>M±m</b>	14,77± 0,53	10,90± 0,28	15,05± 0,27	9,75± 0,32	13,5± 0,63	10,2± 0,73
Процент реагирующих животных	100	100	100	100	100	100
<b>V (%)</b>	9,0	9,7	5,32	9,74	10,44	16,08
<b>Учет реакции через 48 часа, после инъекции</b>						
<b>M±m</b>	12,95± 0,34	9,25± 0,44	15,56± 0,41	11,11± 0,46	11,7± 0,6	7,5± 0,6
Процент Реагирующих животных	100	100	100	100	100	100
<b>V (%)</b>	9,6	14,9	7,66	11,75	11,54	17,6
<b>Учет реакции через 72 часа, после инъекции</b>						
<b>M±m</b>	9,0± 1,15	1,78± 1,16	12,40± 0,5	6,45± 1,22	10,2± 0,64	7,33± 0,13
Процент реагирующих животных	90	30	100	80	100	60
<b>V (%)</b>	20,6	98,2	12	56,6	14,12	91,36

При этом в период 48 часов, после введения разведений туберкулинов вариация не изменяется, но спустя 72 часа после инъекции вариабельность значительно возрастает. Кроме того, определено, что изменяются соотношения воспалительных элементов в период 24-72 часа сопровождающиеся снижением интенсивности кожной реакции ГЗТ от эритемы до бледно - розового цвета, а также значительно снижается инфильтрация.

Таким образом, экспериментально показано, что максимальная интенсивность кожной туберкулиновой реакции ГЗТ в группах морских свинок



сенсibilизированных разными видами микобактерий развивается через 24 часа, после инъекции гомологичных туберкулинов.

#### 4.3.4. Определение кратности использования сенсibilизированных морских свинок для оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов

В соответствии требований нормативно технической документации МЭБ, для лабораторного тестирования биологических характеристик туберкулиновых аллергенов предполагается однократное использование сенсibilизированных морских свинок в период до 6 месяцев, от момента введения в организм микобактерий [63, 322].

Согласно других литературных источников сенсibilизированные животные могут быть использованы многократно, с интервалом между исследованиями не менее 30 суток.

Очевидно, что ограниченное проведение тестов ГЗТ, с использованием сенсibilизированных морских свинок, является экономически затратным. В свою очередь в доступной научной литературе не представлены результаты оценки эффективности многократного использования сенсibilизированных морских свинок, что и определило следующий этап исследования.

Причиной ограниченного использования сенсibilизированных морских свинок может являться снижение интенсивности кожной реакции ГЗТ при последующих тестированиях.

В нормативной документации МЭБ, регламентирующей контроль микобактериальных аллергенов, установлены границы интенсивности кожной реакции ГЗТ используемые для характеристики биологических критериев туберкулиновых аллергенов, соответствующие диапазону от 8 мм. до 25 мм. [63, 322]. Поэтому соответствие интенсивности кожной реакции ГЗТ, на соответствующие дозы, интервалу 8-25 мм. может служить параметром

позволяющем многократное использование лабораторных животных иммунизированных неодинаковыми видами микобактерий.

При этом динамическое исследование интенсивности кожной реакции ГЗТ на расчетные дозы микобактериальных аллергенов, в течение длительного времени позволит оценить длительность использования сенсibilизированных морских свинок, что составило следующий этап экспериментальных работ.

Экспериментальные исследования были осуществлены в 3 группах морских свинок (по 14 голов в каждой группе). Первая группа животных была сенсibilизирована микобактериями бычьего вида; вторая группа морских свинок была сенсibilизирована микобактериями птичьего вида; третья группа морских свинок была сенсibilизирована смесью атипичных микобактерий. Исследования были осуществлены в течение 14 месяцев, после сенсibilизации, (12 месяцев с интервалом 30 дней, а также через 14 месяцев от момента сенсibilизации). Результаты исследования представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Динамика кожной реакции ГЗТ на разные дозы микобактериальных аллергенов в течение 14 месяцев, после сенсibilизации

№	Период после сенсibilизации, мес.	Интенсивность кожной туберкулиновой реакции ГЗТ (M±m)					
		ППД для млекопитающих		ППД для птиц		КАМ	
		Морские свинки сенсibilизированы <i>M.bovis</i>		Морские свинки сенсibilизированы <i>M.avium</i>		Морские свинки сенсibilизированы <i>M.scrofulaceum</i> и <i>M.intracellularae</i>	
		5ME	1 ME	25ME	5ME	40 ЕД	4 ЕД
1	1	15,65±0,27	11,85±0,32	15,85±0,44	13,75±0,63	16,13±0,69	11,31±0,48
2	2	15,86±0,58	13,23±0,42	14,94±0,29	11,67±0,63	17,10±0,60	11,40±0,47
3	3	15,77±0,53	11,82±0,32	14,45±0,53	10,95±0,41	16,13±0,69	11,31±0,48
4	4	14,50±0,39	12,11±0,63	13,44±0,73	9,89±0,53	17,10±0,60	11,40±0,47
5	5	14,30±0,48	11,00±0,59	13,89±0,32	10,61±0,51	18,07±0,50	9,50±0,24
6	6	13,59±0,42	11,59±0,37	14,60±0,48	11,65±0,39	16,22±0,46	10,0±0,33
7	7	16,28±0,58	11,56±0,50	13,25±0,50	9,94±0,28	13,56±0,71	8,88±0,41
8	8	15,20±0,55	12,30±0,53	14,63±0,53	11,19±0,56	16,06±0,49	10,81±0,67
9	9	15,36±0,51	12,27±0,52	14,33±0,55	10,50±0,57	16,06±0,49	10,81±0,67
10	10	14,19±0,50	11,88±0,40	16,33±0,60	14,38±0,56	17,35±0,65	12,45±0,48
11	11	15,89±0,49	13,22±0,49	14,81±0,74	11,50±0,53	14,70±0,44	10,40±0,34
12	12	15,64±0,36	12,73±0,42	14,61±0,20	12,17±0,50	17,05±0,65	11,64±0,61
13	14	15,35±0,38	11,0±0,47	15,09±0,36	12,55±0,56	17,04±0,71	12,42±0,52

Из полученных данных видно, что интенсивность кожной реакции ГЗТ в группах морских свинок сенсibilизированные микобактериями бычьего вида, микобактериями птичьего вида и смесью атипичных микобактерий на гомологичные микобактериальные аллергены не превышала 25 мм. и не снижалась менее 8 мм. в исследуемый период времени.

Таким образом, динамическая оценка ГЗТ на неодинаковые дозировки микобактериальных аллергенов демонстрируют отсутствие снижения интенсивности ГЗТ в течение периода наблюдения (14 месяцев). Полученные данные позволяют многократно использовать сенсibilизированных морских свинок при изучении иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов.

#### 4.3.5. Определение оптимальной диагностической дозы ППД туберкулина для млекопитающих при постановке биологической пробы на морских свинках

В «Наставлении по диагностике туберкулёза животных» 2002 г. для оценки развития туберкулезного процесса у морских свинок, при постановке биологической пробы используется доза ППД туберкулина для млекопитающих – 25 ТЕ [113]. При этом величина биологической активности указанной дозировки туберкулина определена относительно Международного стандарта *PPD-S*, активность которого составляла 50000 МЕ/мг [216, 238]. В настоящее время при проведении контроля микобактериальных аллергенов стандарт *PPD-S* не используется, а повсеместно применяется Международный стандарт *PPD-bovine* [216].

Несоответствие единиц активности туберкулина, использованные ранее и единиц активности, используемые в настоящее время вносит неясность и является причиной погрешности. Сопоставляя значение активности стандартов *PPD-S* и *PPD-bovine* можно определить эквивалент между единицами активности, применяемые ранее и в настоящее время. Для проведения сравнительных

исследований был приготовлен новый эталонный образец ППД для млекопитающих и расфасован в ампулы, в условиях вакуума. Определение вариабельности содержания белка туберкулина, в выборке ампул, продемонстрировало низкие показатели (менее 0,9%), приемлемые для эталонных образцов.

Изучение биологического эквивалента новой эталонной серии туберкулина ППД для млекопитающих, в сравнении с эталоном туберкулина для млекопитающих (*PPD-S*) использованным ранее, в течение нескольких десятилетий составила 50000 Туберкулиновых единиц в мг. белка

Дальнейшие сравнительные исследования активности эталонного туберкулина для млекопитающих (получившего обозначение 4а) в сравнении с Международным стандартом активности туберкулина (*PPD- bovine*) характеризовали новый эталон соответствующем 10000 Международных единиц в мг. белка. Используя значение активности отечественного эталона 4а относительно предшествующего *PPD-S* в сравнении, с результатом полученном при использовании *PPD- bovine* получаем соотношение равное пяти. Таким образом, ранее использованная дозировка очищенного туберкулина для млекопитающих, выраженная относительно стандарта *PPD-S*, используемая для лабораторной диагностики развития туберкулёзного процесса у инфицированных морских свинок равная 25 ТЕ, соответствует значению 5 МЕ относительно нового стандарта активности ППД для млекопитающих *PPD- bovine*.

Известно, что в соответствии Российского ГОСТ 32306-2013 [34] туберкулин для млекопитающих должен характеризоваться активностью в диапазоне от 6600 МЕ до 15000 МЕ. При этом применяя стандартное разведение в лабораторных условиях, указанный интервал не учитывается, следствии чего активность в стандартном разведении будет различной, что в свою очередь может значительно снизить эффективность лабораторной аллергической диагностики. Указанное обстоятельство определило следующий этап исследования. При реализации данного этапа исследования были использованы три серии туберкулина для млекопитающих с граничными значениями активности 6600 МЕ

и 15000 МЕ и средним между граничным, то есть номинальном, равном 10000 МЕ.

С учетом стандартного разведения трех серий туберкулина получаем 3,3; 5; 7,5 МЕ. Указанные дозировки тестировали в трех группах сенсibilизированных аттенуированными микобактериями бычьего вида, морских свинок. Результаты исследования представлены в таблице 22.

Эффективность исследуемых дозировок туберкулина для млекопитающих оценивали по проценту реагирующих животных и интенсивности кожной аллергической туберкулиновой реакции. Величина туберкулиновой реакции более пяти мм. характеризовала положительный результат [113] и позволял рекомендовать для лабораторного использования.

Таблица 22 – Оценка диагностической ценности ППД туберкулина для млекопитающих с различным содержанием МЕ на морских свинках, сенсibilизированных *M. bovis* штамм БЦЖ

Показатели	Группа морских свинок		
	1	2	3
Биологическая активность ППД для млекопитающих МЕ/см <sup>3</sup>	6600 МЕ/см <sup>3</sup>	10000 МЕ/см <sup>3</sup>	15000 МЕ/см <sup>3</sup>
Доверительный интервал (50-200%, p=0,95)	72-140%	70-143%	60-166%
Содержание МЕ в дозе	3,3 МЕ/0,1см <sup>3</sup>	5,0 МЕ/0,1см <sup>3</sup>	7,5 МЕ/0,1см <sup>3</sup>
Интенсивность кожной реакции ГЗТ, М±m, мм.	14,25±0,42	14,75±0,66	16,85±0,48
Процент реагирующих животных	100	100	100

В результате проведенных исследований было выявлено, что исследуемые дозировки ППД для млекопитающих: 3,3 МЕ, 5 МЕ, 7,5 МЕ обуславливают развитие кожной туберкулиновой реакции с интенсивностью более 5 мм. Кроме того, во всех экспериментальных группах процент реагирующих животных был максимальным и соответствовал 100%.

Таким образом, производственные серии туберкулина для млекопитающих с различной биологической активностью 6600-15000 МЕ при разведении в 200 раз обуславливают активность 3,3-7,5 МЕ использование которых позволяет в 100% выявлять состояние повышенной чувствительности обусловленные микобактериями бычьего вида. При этом биологическая активность туберкулина очищенного для млекопитающих выраженная в единицах использованные ранее в соответствии стандарта *PPD-S* равняется 25 ТЕ, в сравнении, с результатом полученном при использовании *PPD- bovine* составляет 5 МЕ, и соответственно 50 ТЕ эквивалентно 10 МЕ.

#### 4.3.6. Изучение иммунных механизмов формирования туберкулиновой гиперчувствительности у морских свинок

Среди различных инфекционных заболеваний животных туберкулёз является повсеместно используемой моделью в иммунологических исследованиях, например при изучении фагоцитоза [103, 104, 111].

В свою очередь фагоцитоз при туберкулёзной инфекции является ключевым механизмом защиты от патогена [286, 287, 290].

Фагоцитоз- это специализированная форма эндоцитоза высших животных осуществляемый специфическими клетками (нейтрофилами и моноцитами) [311, 312, 314].

Основные этапы фагоцитоза включают: хемотаксис, адгезия, постепенное погружение частицы в клетку с формированием фагосомы и фаголизосомы, переваривание частицы и удаление не переваренных остатков [86, 159, 218].

В соответствии литературных данных, при изучении фагоцитоза в процессе моделирования туберкулёзной инфекции на морских свинках были использованы различные виды бактерий, в том числе и микобактерии [44]. В свою очередь исследований с использованием латексных частиц в качестве объекта фагоцитоза в разы меньше.

При этом каждый из объектов фагоцитоза характеризуется своими преимуществами и недостатками. Так, например микроорганизмы наиболее быстро поглощаются фагоцитами, в сравнении с инертным латексом. Вместе с тем использование последнего позволяет характеризовать начальные стадии фагоцитоза.

В исследовании было использовано 36 самок морских свинок, альбиносов, массой свыше 400 гр., распределенные в 6 групп, по 6 голов. Животных первой группы не сенсibilизировали. Животных 5 групп сенсibilизировали внутрикожно, авирулентными микобактериями бычьего вида, в дозе 0,2 мг. штамм БЦЖ [34, 106, 108]. Забор крови осуществляли однократно из сердца, на 3 суки (2 группа), 7 сутки (3 группа), 14 суки (4 группа), 30 сутки (5 группа), через 24 часа после введения ППД для млекопитающих (6 группа).

Исследования представляли два последовательных этапа. На первом этапе было оценено содержание лейкоцитов в крови морских свинок, в период формирования состояния ГЗТ и развития туберкулиновой реакции. На втором этапе был изучен фагоцитоз латексных частиц в период формирования ГЗТ и развития аллергической реакции на ППД для млекопитающих.

Результаты оценки процентного содержания лейкоцитов в крови морских свинок в период формирования состояния ГЗТ, и развития туберкулиновой реакции представлены в таблице 23.

Анализ проведенных исследований демонстрирует отсутствие влияния сенсibilизации морских свинок на процентное содержание палочкоядерных лимфоцитов.

Содержание сегментоядерных нейтрофилов характеризовалось изменениями. Так в сравнении с контрольными животными в период 3, 14 суток от момента сенсibilизации содержание сегментоядерных нейтрофилов значительно не отличались, в то время как в период к 30 суткам, а также после постановки теста ГЗТ количество сегментоядерных нейтрофилов возросло в 1,3 раза и 1,4 раза соответственно.

Таблица 23 – Динамика содержания лейкоцитов в крови морских свинок в период формирования состояния ГЗТ, и развития туберкулиновой реакции

Период после сенсibilизации и морских свинок	Лейкоциты (средние значения, в %).				
	Палочкоядерные нейтрофилы	Сегментоядерные нейтрофилы	Моноциты	Лимфоциты	Эозинофилы
Интakтные	1,67±0,33	49,33±2,25	2,5±0,67	46,5 ± 2,35	0
3 суток	0,33±0,21	46,0 ± 1,26	3,17±0,48	50,5 ± 1,48	0
7 суток	0	45,5 ± 3,24	2,67±0,61	51,83±3,08	0
14 суток	0,67±0,21	44,67±2,64	3,67±0,49	50,67±2,55	0,33±0,21
30 суток	0,82±0,33	63,67±2,13	2,67±0,49	33,0±1,89	0
Через 24 часа, после постановки теста ГЗТ	0,33±0,21	65,17±2,06	2,33±0,71	32,0±1,63	0,16±0,16

Анализ содержания моноцитов продемонстрировал отсутствие значимого колебания, в зависимости от периода сенсibilизации и постановки теста ГЗТ.

Оценка содержания в крови морских свинок эозинофилов в различные периоды после сенсibilизации не продемонстрировало значимых колебаний. Содержание в крови морских свинок лимфоцитов после сенсibilизации на 3 и 7 сутки характеризовалась незначительным отклонением от аналогичного показателя у интактных животных. Вместе с тем к 30 суткам после сенсibilизации, а также после постановки теста ГЗТ снижение лимфоцитов составило в 1,5 раза, а также в 1,7 раза соответственно. Наиболее наглядно результаты представлены на рисунке 2.

Таким образом, выявлено, что к периодам развития состояния ГЗТ у лабораторных животных сенсibilизированных авирулентными микобактериями, а также формирования туберкулиновой реакции на введение микобактериального аллергена- туберкулина для млекопитающих возрастает количество сегментоядерных нейтрофилов, при снижении количества лимфоцитов.



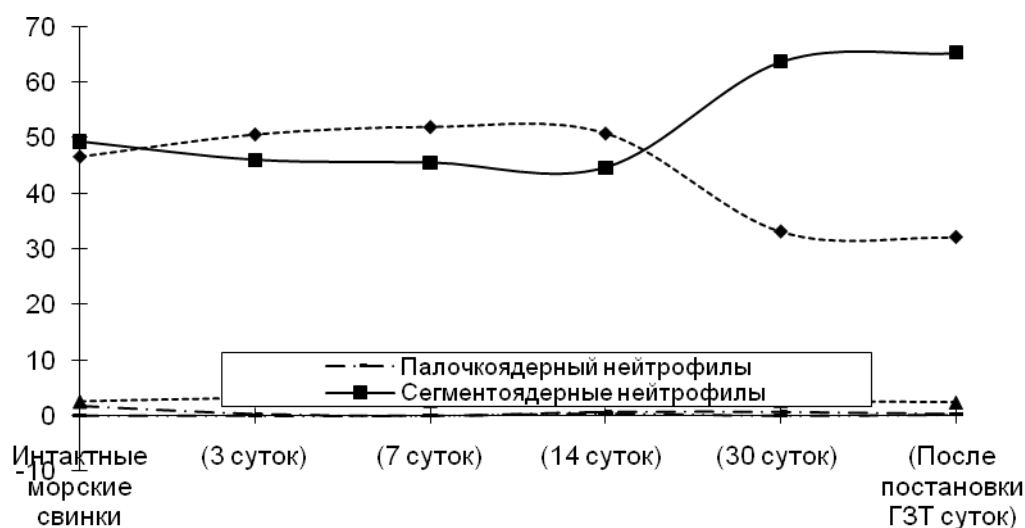


Рисунок 2- Содержание нейтрофилов крови морских свинок, в различные периоды развития состояния ГЗТ.

Следующим этапом исследования была оценка фагоцитоза латексных частиц, в период формирования ГЗТ и развития аллергической реакции на ППД для млекопитающих. Результаты представлены в таблице 24.

Таблица 24– Динамика фагоцитарной активности нейтрофилов крови морских свинок в период развития состояния ГЗТ, а также постановки туберкулиновой пробы

Показатель	Период после сенсibilизации морских свинок					
	Интakтные	3 суток	7 суток	14 суток	30 суток	После теста ГЗТ
Процент фагоцитоза	30,67±3,05	13,83±1,87	35±4,76	52,16±6,09	10,5±1,89	14,16±1,68
Фагоцитарное число	3,67±0,56	0,93±0,26	6,0±1,26	14,83±2,3	14,0±1,91	9,67±1,2

Фагоцитарная активность нейтрофилов крови морских свинок от момента сенсibilизации и весь последующий период характеризовалась периодичностью.

Так на 3 сутки, после сенсibilизации морских свинок, процент фагоцитоза снизился в 2 раза, в то время как на 14 сутки указанный параметр в 2 раза превышал изначальные значения, вновь снижаясь к 30 суткам, а также после постановки теста ГЗТ.

Угнетение поглотительной активности нейтрофилов крови морских свинок регистрируется на третьи сутки от момента внутрикожного введения морским

свинкам микобактерий *M. bovis* БЦЖ, с последующим увеличением фагоцитарного числа более чем в 2 раза, в сравнении с не иммунными животными, что свидетельствует об активации поглотительной функции, на фоне снижения процента фагоцитирующих нейтрофилов. Причем процент фагоцитоза был максимальным на 14 сутки, после сенсibilизации морских свинок. Динамические изменения фагоцитарной активности нейтрофилов представлены на рисунке 3.

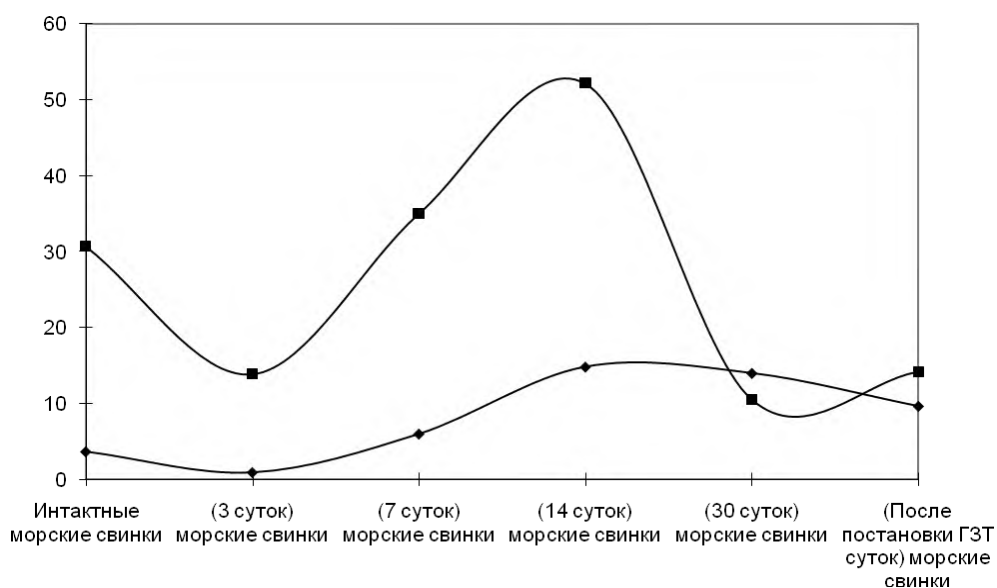


Рисунок 3- Фагоцитарная активность нейтрофилов крови морских свинок, в различные периоды развития состояния ГЗТ.

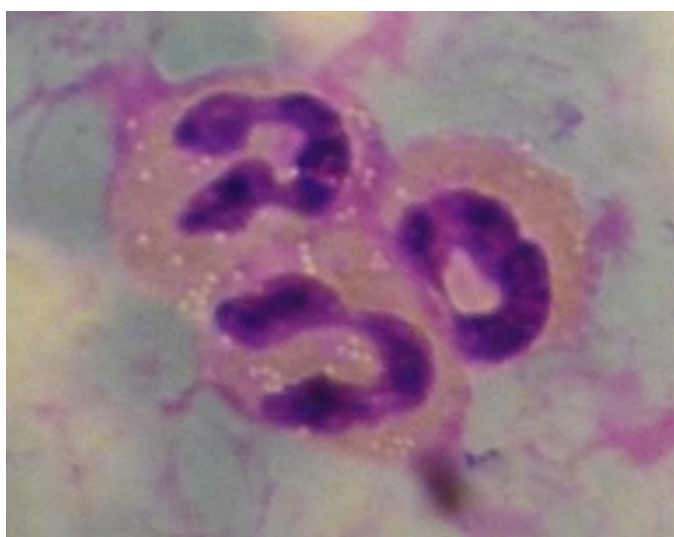


Рисунок 4- Фагоцитоз латексных частиц нейтрофилами крови морских свинок иммунизированных микобактериями бычьего вида.

Таким образом, максимальная интенсивность фагоцитоза регистрируется на 14 сутки с последующим угнетением на 30 сутки, а также после постановки теста ГЗТ.

При туберкулёзной инфекции регистрируются 3 фазы изменения лейкоцитарной формулы. Так первая фаза является нейтрофильной, при которой количество лимфоцитов и моноцитов уменьшается, эозинофилы отсутствуют, а доля нейтрофилов повышена [85, 159, 218].

Выявленные изменения содержания сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов согласуется с литературными данными [231] характеризующие нейтрофильную фазу туберкулёзной инфекции и может быть использована при моделировании.

Таким образом, у морских свинок, сенсibilизированных микобактериями бычьего вида, к периоду развития туберкулиновой аллергии возрастает количество сегментоядерных нейтрофилов, но снижается количество лимфоцитов. Максимальная интенсивность фагоцитоза, после сенсibilизации морских свинок микобактериями бычьего вида, регистрируется на 14 сутки и с последующим снижением как на 30 сутки, так и после постановки теста ГЗТ с ППД - туберкулином для млекопитающих.

#### 4.4. Совершенствование тестов оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов на лабораторных животных

##### 4.4.1. Разработка инструментальных средств оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов

Тесты изучения биологических характеристик туберкулиновых аллергенов, на сенсibilизированных морских свинок, включают несколько этапов. Одним из этапов является определение границ воспалительного процесса (в местах введения разведений испытуемого и контрольного препаратов). Указанная

манипуляция осуществляется посредством детализирования мест развития реакции гиперчувствительности гелевой ручкой и дальнейшим перенесением линейных размеров на прозрачную пленку (целлофан) [31, 216]. Данный этап является длительным и трудоёмким, предполагающий фиксацию каждого животного и обеспечение стандартного натяжения кожи (так как при различном натяжении кожных покровов, линейные размеры меняются) [199, 259].

Снижение влияния перечисленных негативных параметров можно реализовать применением электронных технических приспособлений. Так, например, в настоящее время предложены различные технические устройства для визуального исследования повреждений кожных покровов применяемые в медицинской и лабораторно-криминалистических практиках [177, 178]. Очевидно, что использование технического приспособления позволит значительно улучшить методы оценки биологических характеристик микобактериальных туберкулинов.

Детальный анализ разработанных кожных анализаторов демонстрирует невозможность их использования для оценки биологических характеристик туберкулиновых аллергенов. Так техническое приспособление для анализа кожной реакции ГЗТ у сенсibilизированных морских свинок должно фиксировать и обеспечивать стандартное натяжение кожи, обеспечивать равномерный рассеянный световой поток. Перечисленные характеристики являются основанием для проектирования технического приспособления для оценки биологических параметров микобактериальных туберкулинов.

Принимая во внимание заявленные технические параметры, было спроектировано техническое устройство. Техническое приспособление представлено следующими элементами: легкий дюралюминиевый корпус с смонтированным цифровым устройством формирования изображения. Устройство формирования цифрового изображения дисплеем обращено вверх, объективом к кожной поверхности с сформированной реакцией ГЗТ. Кроме того в нижней части технического приспособления имеются источники света, с различными спектрами излучения. В основании устройства имеется масштабная

линейка в миллиметрах. Жесткий корпус при учете аллергической реакции позволяет снижать погрешности, обусловленные дыхательными движениями животного и одновременно осуществлять фиксацию.

При необходимости получения цифрового изображения с заданным спектральным диапазоном в устройстве предусмотрен кожух.

Полученные цифровые снимки кожной реакции гиперчувствительности на разведения тестируемого и контрольного аллергенов фиксируются в памяти устройства, а в дальнейшем файлы анализируются при помощи фоторедактора на ЭВМ. Сформированные цифровые изображения могут быть соотнесены в пикселях, либо переведены в миллиметры.

Далее были проведены сравнительные исследования при тестировании биологических показателей микобактериальных туберкулинов стандартного способа учета и при помощи разработанного технического устройства. Исследования проводили на морских свинках сенсibilизированными авирулентными микобактериями бычьего вида. Исследования были проведены двумя специалистами.

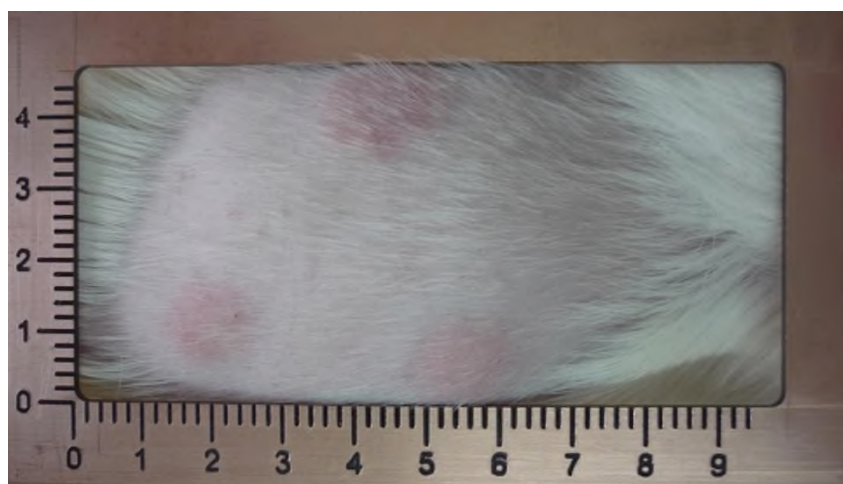


Рисунок 5 – Кожная реакция ГЗТ на различные разведения ППД для млекопитающих у морской свинки, сенсibilизированной *M. bovis* БЦЖ (одно деление равно 2 мм.).

Так первоначально один специалист осуществил исследований аппаратным способом. В дальнейшем другой специалист провел исследование стандартным

подходом, при использовании прозрачной пленки. Полученные результаты анализировались. Материалы исследования представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Визуальный и аппаратный способы оценки биологической активности ППД для млекопитающих.

Показатели	Визуальный способ						Аппаратный способ					
	Туберкулин для млекопитающих											
	Тестируемый			Контроль			Тестируемый			Контроль		
Дозы, МЕ	25	5	1	25	5	1	25	5	1	25	5	1
Среднее значение реакции ГЗТ, мм.	19,0	15,4	12,6	19,8	16,0	11,8	17,8	14,9	11,1	17,4	14,9	11,6
Значение активности, МЕ/см <sup>3</sup>	9300						9900					
Доверительный интервал, при p=0,95	73% - 135%						62%-161%					

Сравнительный анализ результатов исследования визуального способа и аппаратного способа, представленные в таблице демонстрируют достоверный результат на уровне  $p=0,95$ , при соответствии доверительного интервала значениям 50-200%: визуальный способ (73-135%); аппаратный способ (62-161%). Анализ значения биологической активности, в соответствии требований ВОЗ сопоставляемых туберкулинов должна соответствовать  $\pm 0,2$  от значения активности равного единице, или  $\pm 20\%$  от номинального значения активности равного 10000 (Активность= $100\pm 20\%$  или от 80 до 120%). Таким образом, используя визуальный способ как контрольный, а аппаратный как сравниваемый получаем:  $(9900 \times 100) / 9300 = 106\%$ , что полностью соответствует требуемому интервалу.

Многократное тестирование биологических параметров микобактериальных аллергенов (активности и специфичности) продемонстрировало эргономичность технического устройства при проведении исследования.

Таким образом, разработано техническое устройство приемлемое для оценки биологических параметров микобактериальных аллергенов.

#### 4.4.2. Разработка программного обеспечения определения иммунобиологических параметров качества микобактериальных аллергенов

Заключительным этапом лабораторных тестов определения биологических параметров микобактериальных аллергенов (активности и специфичности) является статистическая обработка количественных значений кожной реакции ГЗТ – доза, в соответствии стандартных формул [216]. При этом, статистический анализ, возможно, осуществить, используя расчет с помощью электронных вычислительных систем (инженерных калькуляторов) или посредством специализированного программного обеспечения на ЭВМ [102].

Принимая во внимание специфические требования в отношении программного обеспечения применимого для статистической оценки параметров качества микобактериальных аллергенов и отсутствие её коммерческих вариантов, следующим этапом диссертационной работы была разработка программного обеспечения, позволяющего осуществить расчет биологических параметров микобактериальных аллергенов. Разработка программного обеспечения была проведена в среде программирования *Embarcadero RAD Studio DelphiXE4 (ObjectPascal)*, операционная система: *Windows*.

Известно, что методически методы определения параметра активность и параметра специфичность туберкулиновых аллергенов сходны, за исключением применяемых доз, количества разведений, а также использованием в одном случае гомологичного туберкулина (активность) и гетерологичного (специфичность) как контроля. При этом активность выражается в соответствующих эквивалентных Международных единицах, в то время как специфичность в процентах.

Так биологическая активность туберкулина для млекопитающих должна соответствовать диапазону: 6600 МЕ-15000 МЕ; биологическая активность туберкулина для птиц должна равняться диапазону: 18500 МЕ- 32500 МЕ; активность комплексного аллергена из атипичных микобактерий (все варианты

КАМ, КАМ-2, КАМ-3) должна быть эквивалентной диапазону: 5000 - 10125 ЕД; параметр биологическая активность комплексного аллергена «Параавиум» в соответствии Международных требований должен соответствовать диапазону: 18500 ЕД-32500 ЕД, и также может быть выражен в Международных единицах.

Результаты разработки специализированного софта для расчета параметров активности и специфичности представлены на рисунках 6 и 7.

При разработке дизайна софта исходили из того, что для расчетов необходимы следующие входные данные: дата проведения исследования, дата выпуска серии препарат, дата иммунизации лабораторных животных, наименование препарата, активность контрольного туберкулина, а также интенсивность туберкулиновой реакции на различные разведения тестируемого и контрольного туберкулинов. Предложенный софт рассчитывает и формирует в удобном варианте для восприятия значения: логарифма, антилогарифм активности, активность, определённая в соответствующих единицах. Кроме того рассчитываются ошибка, доверительный интервал. В софте имеются справочные данные, а также возможность печати документа.

Определение биологической активности ППД для млекопитающих.  
 Серия ППД для млекопитающих 25 изготовлена 28.11.12  
 Сенсibilизация норских свинок БЦЖ.  
 Дата сенсibilизации 04.09.12  
 Дата теста 03-04.12.12.

Установка (по умолчанию)  
 Рассчитать

Добавить Удалить N 10

№	Испытуемая			Контрольная		
	25МЕ	5МЕ	1МЕ	25МЕ	5МЕ	1МЕ
1	18	16,5	10	22	16,5	8,5
2	25	18	9,5	18,5	15,5	10
3	22	14,5	8,5	19,5	16,5	9,5
4	18,5	15,5	10	18,5	15	8,5
5	18,5	16,5	12,5	19,5	15,5	9,5
6	17	16,5	12,5	24	16	10
7	19,5	18	10,5	20	15,5	12
8	19,5	16,5	10	19,5	14	12,5
9	20	17	11,5	18	14,5	12
10	18,5	18	12,5	19,5	12	10

Доверительный интервал: 75,3624373776103 132,69209898154

Содержание МЕ/мл Контрольного ППД туберкулина: 10000

Биологическая активность ППД туберкулина для млекопитающих МЕ/мл: 12386,3913764346

Мясоедов Ю. М. Mail: Myasoe dovYuriy@Yandex.ru

Рисунок 6 – Вариант программного анализа параметра активность туберкулина для млекопитающих.



Biological specificity purified tuberculin for mammals

Меню Справка

Определение специфичности ППД для млекопитающих.

Серия ППД для млекопитающих 25 изготовлена 28.11.12  
 Сенсibilизация морских свинок M.avium  
 Дата сенсibilизации 04.09.12  
 Дата теста 03-04.12.12.

Установка (по умолчанию)  
 Рассчитать

Добавить Удалить Загрузить Сохранить

№	Испытуемая		Контрольная	
	1000	40	50	2
1	20	12	18	12,5
2	18,5	14,5	19,5	12
3	19	12	20	14,5
4	17,5	13,5	22	10
5	18	15	20	12,5
6	19,5	14,5	21	9,5
7	22	12	19,5	14,5
8	21	10	18,5	12,5
9	20	12,5	19	12
10	19,5	14	18,5	14,5

Ср.зн. 19,5 13 19,6 12,45

Доверительный интервал: 64,4398865721535 195,183148413648

Специфичность ППД туберкулина для млекопитающих % 5,55975864345267

Мясоедов Ю. М. Mail: Myasoedov.Yuriy@yandex.ru

IgR= 0,04608593 R 1,11195172  
 -0,144758624398204 <lgR> 0,236930493101855

b 4,88218375442545  
 mlgR 0,0954222793750149  
 2mlgR 0,19084455875003

Рисунок 7 – Вариант программного анализа параметра специфичность туберкулина для млекопитающих

Учитывая требования нормативов использования необходимого количества животных (не менее 8) в софте интегрированы функция добавить необходимое количество животных. При игнорировании указанной функции автоматически расчет осуществляется с учетом 10 животных. После осуществления всех расчетов и выхода из софта, автоматически предлагается сохранить результат.

Таким образом, разработан специализированный софт, позволяющий осуществлять статистическую обработку результатов при оценке биологических параметров туберкулиновых аллергенов, в том числе и перспективных.

#### 4.4.3. Совершенствование способов оценки иммунобиологических параметров комплексных аллергенов

##### 4.4.3.1. Совершенствование способа оценки биологической активности КАМ

Биологическая активность микобактериальных туберкулинов оценивается на лабораторных морских свинках, сенсibilизированных теми видами микобактерий, из которых изготавливается аллерген [92, 93, 95]. В свою очередь комплексный аллерген из атипичных микобактерий характеризуется сложным составом, представленным смесью аллергенов выделенных из *M. scrofulaceum* и выделенных из *M.intracellularae* [113, 223].

Учитывая указанное обстоятельство оценить активность комплексного аллергена возможно посредством использования сенсibilизации морских свинок микобактериями, из которых приготовлен комплексный туберкулин.

Также оценить активность комплексного аллергена возможно на сенсibilизированных морских свинках микобактериями характеризующиеся высокой степенью родства с аллергенами входящими в состав КАМ.

В соответствии современной номенклатуры [221] микобактерии *M. avium* и *M. intracellularae* относятся к комплексу *M. avium – intracellularae*. При этом в случае реализации указанного варианта оценить активность КАМ возможно в отношении Международного стандарта ППД для птиц. Принимая во внимание изложенное следующим этапом исследования была оценка активности КАМ в двух группах морских свинок: сенсibilизированных смесью атипичных микобактерий, из которых приготовлен КАМ, а также на морских свинках иммунизированных микобактериями птичьего вида.

Тестируемым препаратом является КАМ, а контролем служил ППД туберкулин для птиц, эквивалентный по биологической активности в отношении Международного стандарта *PPD-avium*.

При реализации исследования в предварительных исследованиях были подобраны парные дозировки, обуславливающие приблизительно равнозначную интенсивность кожной туберкулиновой реакции.

Результат исследования оценивали по значению активности, а достоверность по доверительному интервалу. Результаты исследования представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Оценка параметра активности КАМ в группах морских свинок, сенсibilизированных смесью атипичных микобактерий *M.intracellulareae* и *M.scrofulaceum* и *M. avium*

Показатели	Животные сенсibilизированные							
	смесью микобактерий <i>M. intracellulare</i> и <i>M.scrofulaceum</i>				<i>M. avium</i>			
Аллергены	КАМ		ППД для птиц		КАМ		ППД для птиц	
Дозы	20 ЕД.	2 ЕД.	200 МЕ	20 МЕ	20 ЕД.	2 ЕД.	200 МЕ	20 МЕ
M±m	20,69± 0,70	11,44± 0,55	20,19± 0,53	12,31± 0,74	17,11± 0,61	10,0± 0,40	19,39± 0,30	14,11± 0,61
N	9				9			
R	0,95				0,31			
Доверительный интервал (50-200%, p=0,95)	71-140 %				70-142%			

Результаты исследования, изложенные в таблице, демонстрируют различную биологическую активность КАМ, в отношении ППД для птиц в группе животных сенсibilизированных смесью микобактерий, гомологичных КАМ, а также в группе животных сенсibilизированных птичьими патогенными микобактериями. Так в группе морских свинок иммунизированных атипичными микобактериями двух видов, коэффициент активности соответствовал 0,95, в то время как аналогичный показатель в группе морских свинок иммунизированных птичьими микобактериями равнялся 0,31. При этом результат, полученный в двух группах, являлся достоверным (доверительный интервал в обоих случаях соответствовал диапазону 50 - 200%). При этом определяя соотношение коэффициентов активности, полученные в двух группах определяется соотношение равное трём. Полученный результат свидетельствует о большей степени гомологии КАМ в отношении сенсibilизации лабораторных животных

атипичными микобактериями разных видов, в сравнении с группой животных иммунизированных птичьими микобактериями.

Учитывая предпочтительность использования в качестве контроля в отношении КАМ комплексного аллергена и сенсibilизации атипичными микобактериями были проведены исследования по разработке контрольной серии комплексного аллергена.

В результате было получено два моноаллергена сублимированные в условиях вакуума. Оценка биологической активности моноаллергенов определена в гомологичной сенсibilизации с определением минимального количества белка обуславливающего требуемую интенсивность кожной реакции ГЗТ. При приготовлении разведений моноаллергенов использован интервал равный 2,5. Результаты исследования изложены в таблице 27 и таблице 28.

Таблица 27 – Определение активности моноаллергена *M. intracellulae*, на морских свинках иммунизированных микобактериями *M. intracellulae*

Показатели	Доза мг. белка в дозе					
	0,03	0,012	0,00483	0,0019	0,00073	0,00031
M±m	17,42 ±0,66	15,58 ±0,83	13,25 ±1,04	12,25 ±1,13	7,42 ±0,2	6,42 ±0,24

Таблица 28 – Определение активности моноаллергена *M. scrofulaceum*, на морских свинках иммунизированных микобактериями *M. scrofulaceum*

Показатели	Доза мг. белка в дозе					
	0,1032	0,04128	0,016512	0,0066048	0,00264	0,00105
M±m	16,58 ±1,23	13,75 ±1,13	10,75 ±1,07	10,58 ±0,72	7,33 ±0,33	4,08 ±1,36

Оценку 1 ЕД определяли исходя из следующих положений:

1. ЕД должна обеспечивать реакционность у всех использованных сенсibilизированных морских свинок (при использовании подобранных ранее условий сенсibilизации); 2. Реакционность определять при значении реакции около 7 мм.

В результате проведенных исследований 1 Единица моноаллергена *M. intracellulae* составляет 0,000773 мг., а моноаллергена *M. scrofulaceum* составляет 0,00264 мг.

Таким образом, оценку биологической активности комплексного аллергена из атипичных микобактерий целесообразно оценивать на гомологичной сенсibilизации морских свинок *M. scrofulaceum* и *M. intracellulareae*.

#### 4.4.3.2. Совершенствование способа оценки специфичности КАМ

Известно, что микобактериальная клетка характеризуется сложным строением, и до сих пор многие вопросы строения микобактериальной клетки не изучены. При этом особенностью рода микобактерий является антигенный состав, причем микобактерии разных видов содержат как видовые, так и родовые [113, 272, 332].

Туберкулиновые аллергены, характеризующиеся высоким содержанием родовых антигенов являются не приемлемыми для практики диагностикумами [73, 93, 376]. Поэтому современные классические технологии изготовления микобактериальных аллергенов разработаны с учетом значительного снижения содержания родовых антигенов и увеличения содержания видовых аллергенов в туберкулине [7, 8, 180].

При этом косвенным способом оценки влияния родовых антигенов на диагностические свойства микобактериального аллергена возможно использование критерия специфичность.

В соответствии различных нормативных литературных источников определение параметра специфичность туберкулина очищенного для млекопитающих проводится на лабораторных животных (морских свинках) иммунизированных микобактериями птичьего вида, в то время как туберкулина для птиц, на лабораторных животных иммунизированных микобактериями бычьего вида [216, 322, 387].

Ранее, в отношении комплексного аллергена из атипичных микобактерий, был разработан способ оценки специфичности, который предполагал

сравнительные исследования в двух группах морских свинок, иммунизированных микобактериями бычьего вида (одна группа) и одновременно атипичными микобактериями, из которых приготовлен КАМ. При этом использовалась одна доза КАМ и одна доза туберкулина для млекопитающих. Выраженность аллергической реакционности на тот или иной препарат оценивался по критерию знаков (методике аналогичной при тестировании крупного рогатого скота) [7, 54]. Вместе с тем описанная практика контроля специфичности комплексного аллергена не соответствует современным Международным практикам.

Следующим этапом исследования была разработка способа оценки специфичности комплексного аллергена из атипичных микобактерий, в соответствии требований современных Международных практик. При этом оценку специфичности комплексного аллергена следует осуществлять в двух группах морских свинок: иммунизированных гомологичными микобактериями; иммунизированных гетерологичными микобактериями.

Также необходим подбор оптимальных доз микобактериальных аллергенов: КАМ и ППД для млекопитающих, позволяющие проводить сравнительную оценку специфичности. Подбор дозировок микобактериальных туберкулинов предусматривал оценку аллергической реакционности, как в гомологичной, так и в гетерологичной системах иммунизации, при соответствии диапазону от 8 до 25 мм. Очевидно, что максимальные дозировки должны обуславливать не более 25 мм. реакционность, в то время как минимальные не менее 8 мм., у всех животных особей.

Проведенные комплексные исследования в группе морских свинок иммунизированных микобактериями бычьего вида продемонстрировали целесообразность применения доз комплексного аллергена: 675 ЕД и 25 ЕД (между дозами интервал составил 27), в то время как туберкулина для млекопитающих: 25 МЕ и 1 МЕ (между дозами интервал составил 25).

Также в группе лабораторных животных иммунизированных атипичными микобактериями, из которых приготовлен комплексный аллерген дозировки в отношении КАМ должны соответствовать: 40 ЕД и 4 ЕД (между дозами интервал

составил 10), в то время, как туберкулина для млекопитающих: 1000 МЕ и 100 МЕ (между дозами интервал составил 10). Результаты исследования представлены в таблице 29.

Таблица 29 – Оценка эквивалентности расчетных доз КАМ и ППД для млекопитающих

Показатели	Морские свинки сенсibilизированные							
	Микобактериями бычьего вида				Смесью атипичных микобактерий			
	Препарат				Препарат			
	КАМ		ППД для млекопитающих		КАМ		ППД для млекопитающих	
Доза	675 ЕД	27 ЕД	25 МЕ	1 МЕ	40 ЕД	4 ЕД	1000 МЕ	100 МЕ
<b>КАМ серия № 1</b>								
М±m, мм.	19,94±0,87	14,22±0,85	18,5±0,47	12,61±0,65	15,75±0,31	11,0±0,49	16,67±0,38	11,33±0,41
ПРЖ	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>КАМ серия № 2</b>								
М±m, мм.	20,63±0,74	14,83±0,64	19,75±0,86	13,29±0,48	16,13±0,69	11,31±0,48	12,75±0,65	9,94±0,61
ПРЖ	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>КАМ серия № 3</b>								
М±m, мм.	18,33±0,37	12,61±0,54	17,83±0,57	12,5±0,22	18,69±0,56	13,63±0,97	17,31±0,36	12,44±0,63
ПРЖ	100	100	100	100	100	100	100	100

**Сокращения:** ПРЖ- процент реагирующих животных.

Из полученных результатов исследования видно, что расчетные дозы КАМ и дозы аллергена для млекопитающих в группе морских свинок, сенсibilизированных микобактериями бычьего вида, характеризуются выраженной реакцией ГЗТ и соответствующие интервалу 8-25 мм. Процент реагирующих животных соответствовал 100.

Кроме того, в группе морских свинок, сенсibilизированных смесью атипичных микобактерий видно, что расчетные дозы КАМ: 40 и 4 ЕД и туберкулина очищенного ППД для млекопитающих: 1000 МЕ и 100 МЕ сопровождается развитием кожной реакции ГЗТ и процентом реагирующих животных равном 100 и соответствие диаметра кожной аллергической реакции интервалу 8-25 мм. Таким образом, определены дозы аллергенов для оценки специфичности КАМ, ППД для млекопитающих в соответствии требованиям МЭБ.

Следующим этапом исследования было сравнение результатов оценки специфичности КАМ в соответствии требований МЭБ с результатами

определения типоспецифичности КАМ, согласно ранее использованной методики [209]. В исследовании были использованы 8 опытных серий КАМ. Результаты исследования изложены в таблице 30.

При осуществлении контроля параметра специфичность серий аллергена очищенного из атипичных микобактерий изготовленного в разный временной интервал в соответствии требований МЭБ было выявлено, что расчетное значение не превышает 10%, при соответствии доверительного интервала границам 50-200% ( $p=0,95$ ). Параллельный анализ видовой специфичности КАМ демонстрирует в группе животных иммунизированных микобактериями бычьего вида, выраженность в достоверно большей аллергической реакционности на туберкулин для млекопитающих, и наоборот в группе животных иммунизированных атипичными микобактериями выраженность аллергической реакционности на комплексный аллерген, в сравнении с туберкулином для млекопитающих, на соответствующем уровне достоверности,  $p=0,95$ .



Таблица 30 – Сравнительный анализ способов оценки специфичности аллергена комплексного из атипичных микобактерий (КАМ)

Номер серии КАМ	Наименование теста			
	Специфичность (в соответствии требований МЭБ)		Видовая специфичность (в соответствии требований ТУ 10-19-518-87)	
	Сенсибилизация морских свинок			
	Микобактериями бычьего вида	Смесью атипичных микобактерий	Микобактериями бычьего вида	Смесью атипичных микобактерий
1	Процент специфичности - 5,42 %; Доверительный интервал 61-164; n =9	Процент специфичности - 2,21; Доверительный интервал 54-185; n =9	Аллергическая реакционность выражена на ППД для млекопитающих, чем на КАМ, n =12; (p=0,95)	Аллергическая реакционность выражена на КАМ, чем на ППД для млекопитающих, n =15; (p=0,95)
2	Процент специфичности - 5,61; Доверительный интервал 58-170; n =12	Процент специфичности - 2,93; Доверительный интервал 55-182; n =8	Аллергическая реакционность выражена на ППД для млекопитающих, чем на КАМ, n =12; (p=0,95)	Аллергическая реакционность выражена на КАМ, чем на ППД для млекопитающих, n =15; (p=0,95)
3	Процент специфичности - 5,83; Доверительный интервал 52-192; n =8	Процент специфичности - 2,26; Доверительный интервал 65-192; n =10	Аллергическая реакционность выражена на ППД для млекопитающих, чем на КАМ, n =15; (p=0,95)	Аллергическая реакционность выражена на КАМ, чем на ППД для млекопитающих, n =13; (p=0,95)
4	Процент специфичности - 6,18; Доверительный интервал 51-196; n =12	Процент специфичности - 2,97; Доверительный интервал 65-153; n =13	Аллергическая реакционность выражена на ППД для млекопитающих, чем на КАМ, n =15; (p=0,95)	Аллергическая реакционность выражена на КАМ, чем на ППД для млекопитающих, n =19; (p=0,95)
5	Процент специфичности - 6,54; Доверительный интервал 51-194; n =9	Процент специфичности - 3,55; Доверительный интервал 79-127; n =9	Аллергическая реакционность выражена на ППД для млекопитающих, чем на КАМ, n =15; (p=0,95)	Аллергическая реакционность выражена на КАМ, чем на ППД для млекопитающих, n =16; (p=0,95)
6	Процент специфичности - 5,19 Доверительный интервал 52-193; n =10	Процент специфичности - 2,96; Доверительный интервал 64-156; n =11	Аллергическая реакционность выражена на ППД для млекопитающих, чем на КАМ, n =15; (p=0,95)	Аллергическая реакционность выражена на КАМ, чем на ППД для млекопитающих, n =15; (p=0,95)
7	Процент специфичности - 6,16 Доверительный интервал 50-199; n =10	Процент специфичности - 2,37; Доверительный интервал 67-149; n =10	Аллергическая реакционность выражена на ППД для млекопитающих, чем на КАМ, n =13; (p=0,95)	Аллергическая реакционность выражена на КАМ, чем на ППД для млекопитающих, n =15; (p=0,95)
8	Процент специфичности - 7,05; Доверительный интервал 61-162; n =10	Процент специфичности - 1,54; Доверительный интервал 56-179; n =10	Аллергическая реакционность выражена на ППД для млекопитающих, чем на КАМ, n =17; (p=0,95)	Аллергическая реакционность выражена на КАМ, чем на ППД для млекопитающих, n =16; (p=0,95)

**Примечание:** препарат считается специфичным при значениях до 10% и доверительном интервале от 50 до 200%

Таким образом, предложен вариант оценки специфичности комплексного аллергена из типичных микобактерий в соответствии требований МЭБ.

#### 4.5. Изучение стабильности иммунобиологических свойств микобактериальных аллергенов длительного периода хранения

Стабильность иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов, в период гарантированного хранения является залогом эффективности аллергической диагностики микобактериальных инфекций животных [136, 137].

В настоящее время все коммерчески производимые микобактериальные аллергены являются стабильными лекарственными формами в заданный период, что характеризует эффективность применяемых технологий получения и подтверждается в результате испытаний в соответствующих референтных лабораториях.

Вместе с тем фундаментально значение имеет оценка стабильности иммунобиологических свойств микобактериальных аллергенов хранившиеся в течение длительного периода времени (многократно превышающем гарантированный период хранения), изготовленные в соответствии различных технологий.

Для проведения оценки стабильности микобактериальных аллергенов были использованы следующие образцы: АТК, безальбумозный туберкулин, *HCSM* туберкулин.

В послевоенный период (1946 году) ветеринарный специалист института экспериментальной ветеринарии майор ветеринарной службы Щуревский после увольнения из Красной армии привез альттуберкулин для млекопитающих в ВИЭВ, где образцы архивировали и хранили, при температуре 2°C-8°C.

Безальбумозный туберкулин и *HCSM* туберкулины были любезно предоставлены доктором биологических наук, профессором Козловым В.Е. (ФКП

«Курская биофабрика»). В свою очередь на предприятие указанные препараты были доставлены в 90 годах из ВГНКИ.

Анализ информации, представленной на первичной и вторичной упаковках АТК не позволил определить дату изготовления. Детальный анализ надписей представленные на этикетке и упаковочном материалах содержал информацию представленную ниже.

1. Альттуберкулин. На этикетке с препаратом имеется следующая информация: *Perlsucht – Tuberculin, Beringwerke A.G., Marburg/L. 5 ml.*

Основываясь на данные словаря иностранных слов первое немецкое слово, представленное на этикетке- *Perlsucht*, аналогично русскому языку обозначающее туберкулёз крупного рогатого скота. Также в соответствии [www.multitran.com](http://www.multitran.com) слово *Perlsucht* переводится как бычий туберкулин Роберта Коха.

На этикетке видны литеры В и W расположенные внутри шестиконечной звезды, вероятно означающее: *Beringwerke*. Принимая во внимание данное обстоятельство можно утверждать, что исследуемый препарат изготовлен довоенный период, 40 годов прошлого века.

Отсутствие полной информации относительно немецкого альттуберкулина, как в доступной литературе, так и на Интернет ресурсах, служили поводом для обращения за дополнительной информацией в Филиппс университет в Марбурге. В ответ пришла информация в которой указывалось, что указанный препарат был произведен в Марбурге в первом-втором десятилетии двадцатого века.

Препарат расфасован во флаконы из темно-коричневого стекла, закупоренный древесной пробкой, которая закатана в бумагу и перевязана нитью и опечатана свинцовой пломбой.



Рисунок 8. – *Perlsucht – Tuberculin*.

2. Туберкулин свободный от альбумоз (*Albumose freies Rinder-Tuberculin*).  
 Описание препарата представлены на первичной (ампулы) и вторичной упаковках (коробка). Информация, представленная на первичной упаковке, содержит следующую информацию: Препарат протестирован в институте имени Пауля Эрлиха, во Франкфурте- на- Майне. Не замораживать, хранить при температуре до +15°C.

Описание на вторичной упаковке: цилиндрические ампулы, содержащие 1,8 мл. безальбумозного туберкулина для ветеринарного применения. 1 мл. раствора туберкулина содержит 50000 МЕ в виде раствора для внутрикожного введения.

Кроме того, представлена надпись, аналогичная АТК: *BERINGWERKE AG MARBURG-LAHN*. Дата изготовления: 28.02.86г.



Рисунок 9. – *Albumose freies Rinder-Tuberculin*.

3. Бычий *HCSM* туберкулин (*Intravac poly tuberculine bovine HCSM*). Описание препарата представлены на первичной упаковке (ампулы) и вторичной упаковке (коробки) на французском языке. Туберкулин изготовлен с использованием штамма микобактерий бычьего вида AN-5. Туберкулин используется для постановки внутрикожной туберкулиновой реакции. Титр 10000 кожных туберкулиновых единиц (эквивалентные 50000 Международным единицам). Коробка с препаратом содержит 10 ампул с 1,8 мл. туберкулином. Одна диагностическая доза для крупного рогатого скота составляет 0,2 мл. Хранить при температуре 2-8°C. Не замораживать, изготовлен в мае 1985 года.

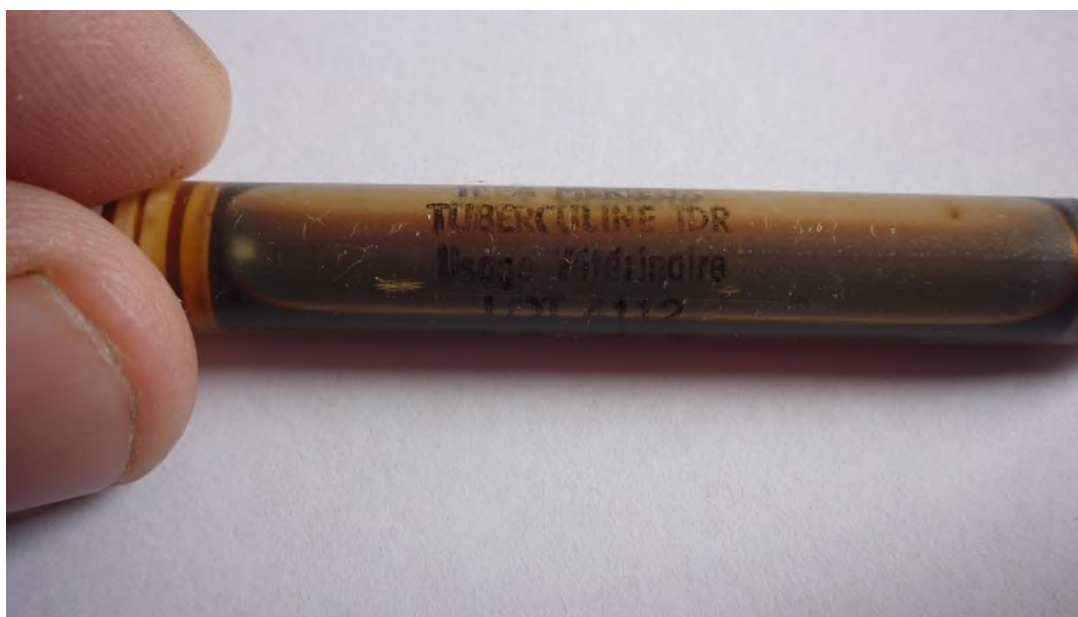


Рисунок 10. -*Intravac poly tuberculine bovine HCSM*

В доступной литературе сведений о стабильности изучаемых препаратов не выявлено. Только в отношении препарата Perlsucht – Tuberculin указано, что его биологические характеристики сохраняются не менее 10 лет [210, 211]. При этом период гарантированного сохранения биологических свойств равен 5 годам [27].

В отношении *Albumose freies Rinder-Tuberculin* и *tuberculine bovine HCSM* изготовленных по усовершенствованным технологиям, в сравнении с АТК (в соответствии первичной и вторичной упаковок) описан предельный срок хранения равный 3 годам.

Анализ доступной зарубежной литературы не позволил выявить нормативные документы в отношении производства и контроля указанных препаратов, кроме докладов ВОЗ [61-63].

Вместе с тем была выявлена Российская документация по контролю альттуберкулина для млекопитающих – ГОСТ 13910-72 и контролю туберкулина очищенного ППД для млекопитающих - ГОСТ 16739-88.

Детальный анализ методов контроля изложенные в Государственном стандарте 1972 года продемонстрировал невозможность их реализации на современном этапе, ввиду отсутствия Международного стандарта АТК, а также необходимого количества больных туберкулезом коров. В тоже время

Государственный стандарт туберкулина очищенного ППД для млекопитающих 1988 года и Государственный стандарт на туберкулины для животных от 2013 года позволяют осуществить сравнительные исследования туберкулиновых препаратов, для диагностики туберкулёза животных, с учетом современных требований.

Поэтому для реализации указанного этапа исследования первоначально был проведен анализ методов контроля, в соответствии различных нормативных документов.

В соответствии Международных практик контроля лекарственных препаратов одним из методов контроля, который легко реализовать, является оценка внешнего вида. Данный вид контроля может быть осуществлен в отношении исследуемых туберкулинов.

Следующим тестом, характеризующим диагностическую эффективность туберкулина, является специфичность. При этом ГОСТ на альттуберкулин и ГОСТ, используемый в настоящее время, в отношении параметра специфичность методически разнятся. Так в соответствии ГОСТа для АТК, препарат является специфичным в случае отсутствия воспалительного процесса в месте внутрикожной его инъекции. В соответствии современного ГОСТ на туберкулины для животных препарат специфичен, если его активность менее 10% в гетерологичной системе (сенсбилизации).

Ключевым параметром качества туберкулиновых аллергенов является оценка реактогенности. Тест описан в ГОСТ 16739-88 и ГОСТ 32306-2013 и предполагает определение воспалительной реакции, в месте внутрикожной инъекции в дозе  $\frac{1}{4}$  диагностической дозировки используемой для крупного рогатого скота. Развитие воспалительной реакции не более пяти миллиметров или её отсутствие характеризует туберкулин как ареактогенный.

Важным параметром микобактериальных аллергенов является активность. Так в соответствии ГОСТ 13910-72 критерий активность микобактериального аллергена оценивался на инфицированном туберкулёзными микобактериями крупном рогатом скоте. Пригодным для практического использования являлся

препарат характеризующийся формированием в месте внутрикожного введения характерной туберкулиновой реакции, соответствующей контрольному образцу туберкулина.

В соответствии современного ГОСТ 32306 определение параметра активность туберкулина для млекопитающих проводится в сравнении с контрольным аллергеном на морских свинках сенсibilизированных гомологичными микобактериями.

Исторический анализ литературных источников демонстрирует, что в период производства *Perlsucht – Tuberculin* в Марбурге, актуальным являлся впервые предложенный Международный стандарт для АТК. При этом одна единица активности соответствовала 100000 МЕ/мл.

С введением в практику аллергодиагностики очищенных форм ППД в 1952 году был предложен Международный стандарт *PPD-S*, с содержанием в 1 мг- 50000 МЕ (IU), а с учетом восстановления жидкой формы из сублимированного состояния в растворителе 1 мг белка соотносилось с 1 мл раствора, в результате чего получалась активность 50000 МЕ/см<sup>3</sup> [216].

Указанный Международный стандарт действовал в период производства *Albumose freies Rinder-Tuberculin u tuberculine bovine HCSM*.

Диагностическая способность микобактериального аллергена (не зависимо АТК или туберкулина ППД для млекопитающих) идентифицировать не менее 80-90% инфицированных патогенными микобактериями особей характеризовалась как одна единица [136, 216].

Очевидно, что исследуемые микобактериальные аллергены не зависимо от периода их изготовления характеризуются диагностической эффективностью.

Имеющиеся в распоряжении современные Интернациональные стандарты туберкулина для млекопитающих и птиц позволяют провести сравнительное изучение активности тестируемых туберкулинов и результаты интерпретировать в используемых современных единицах активности.

Резюмируя результаты анализа методов контроля исследуемых туберкулинов, очевидно, что оценку стабильности биологических свойств



возможно оценить по критериям активности (в гомологичной и гетерологичных системах), реактогенности, а также внешнему виду.

Макроконтроль АТК, а также *HCSM* продемонстрировал соответствие нормативному документу ГОСТ 13910-72 (коричневая, непрозрачная, вязкая жидкость, без признаков расслоения). В свою очередь туберкулин свободный от альбумоз характеризовался коричневым цветом, прозрачный при просмотре, но при взбалтывании визуализировались кристаллы, которые легко растворились.

Оценка содержимого объема исследуемых микобактериальных аллергенов выявило соответствие объема, указанного на этикетках, что исключает возможность испарения жидкой части и концентрирования микобактериальных белков.

После проведения макроконтроля оценивали параметр активность на морских свинках, иммунизированных живыми авирулентными микобактериями бычьего вида. При оценке биологической активности микобактериальных аллергенов титрование осуществляли из расчета предполагаемого содержания в см<sup>3</sup> раствора 10000 Международных единиц. Результаты исследования изложены в таблицах 31, 32, 33.

Таблица 31 – Биологическая активность *Perlsucht – Tuberculin*

Номер морской свинки	<i>Perlsucht – Tuberculin</i> (АТК)			Эталон ППД для млекопитающих		
	дозы, ЕД			дозы, МЕ		
	25	5	1	25	5	1
1	20,0	16,5	13,0	22,0	15,0	12,0
2	21,0	15,5	10,5	18,0	16,0	12,0
3	16,0	17,0	11,5	17,5	16,0	15,0
4	17,0	13,5	11,5	22,5	15,5	12,5
5	19,0	14,0	11,5	18,5	15,5	11,0
6	18,0	16,0	13,0	18,0	16,5	11,0
7	17,5	15,5	12,0	18,5	15,0	12,0
8	19,0	16,0	12,0	20,0	16,0	12,5
<b>M±m</b>	18,44± 0,58	15,50± 0,42	11,71± 0,27	19,0± 0,61	15,79± 0,17	12,29± 0,48
<b>Биологическая активность 8000 МЕ/см<sup>3</sup></b>						
<b>Доверительный интервал 72%-139% (p=0,95)</b>						

Таблица 32 – Биологическая активность *Albumose freies Rinder-Tuberculin*

Номер морской свинки	<i>Albumose freies Rinder-Tuberculin</i>			Эталон ППД для млекопитающих		
	дозы, ЕД			дозы, МЕ		
	25	5	1	25	5	1
<b>1</b>	14,5	12,0	8,0	21,5	17,0	14,5
<b>2</b>	15,0	10,0	8,0	22,0	17,5	15,0
<b>3</b>	14,5	10,5	8,5	21,5	17,5	16,0
<b>4</b>	15,0	10,5	10,0	20,5	17,5	15,5
<b>5</b>	15,5	10,5	9,5	18,5	16,5	14,5
<b>6</b>	15,5	10,0	9,0	22,5	17,0	15,5
<b>7</b>	17,0	12,0	10,0	18,5	16,5	15,0
<b>8</b>	15,5	10,5	8,0	19,0	18,5	14,0
<b>9</b>	15,0	12,5	10,0	19,5	18,0	14,5
<b>10</b>	15,0	12,0	10,5	20,0	18,5	10,0
<b>M±m</b>	15,25± 0,23	11,05± 0,3	9,28± 0,30	20,22± 0,47	17,50± 0,24	14,44± 0,56
<b>Биологическая активность 500 МЕ/см<sup>3</sup></b>						
<b>Доверительный интервал 73-137% (p=0,95)</b>						

Таблица 33 – Биологическая активность *tuberculine bovine HCSM*

Номер морской свинки	<i>Tuberculine bovine HCSM</i>			Эталон ППД для млекопитающих		
	дозы, ЕД			дозы, МЕ		
	25	5	1	25	5	1
<b>1</b>	12,0	9,0	8,5	22,0	16,5	13,0
<b>2</b>	14,5	10,0	8,5	22,5	16,5	14,5
<b>3</b>	12,0	9,0	8,5	21,5	18,5	16,0
<b>4</b>	14,5	12,0	8,0	22,5	17,0	14,5
<b>5</b>	16,5	10,0	9,5	20,0	16,0	12,5
<b>6</b>	14,0	12,5	9,0	23,0	16,5	14,5
<b>7</b>	16,5	12,5	9,5	22,5	18,5	17,0
<b>8</b>	14,0	10,5	8,0	20,5	16,5	14,5
<b>9</b>	14,5	10,0	9,5	20,5	18,0	16,0
<b>10</b>	14,5	10,0	8,5	22,5	21,0	17,5
<b>M±m</b>	14,30± 0,48	10,55± 0,42	8,78± 0,20	21,72± 0,35	11,61± 0,5	15,22± 0,49
<b>Биологическая активность 200 МЕ/см<sup>3</sup></b>						
<b>Доверительный интервал 70-143% (p=0,95)</b>						

Результат определения параметра активность немецкого АТК демонстрирует значение 8000 МЕ (в соответствии современного Интернационального стандарта), что соответствует требуемому диапазону: от 6600 до 15000 МЕ на миллилитр. Это означает, что использование альттуберкулина, для аллергической диагностики туберкулёза позволит выявить инфицированных животных.

Вместе с тем биологическая активность *Albumose freies Rinder-Tuberculin u tuberculine bovine HCSM* характеризовалась пониженными значениями: 500 и 200 МЕ соответственно на уровне достоверности, соответствующие интервалу 50-200% ( $p=0,95$ ).

Последующие исследования предполагали определение критерия специфичность на лабораторных животных иммунизированных живыми микобактериями птичьего вида. Результаты исследования специфичности туберкулинов представлены в таблицах 34, 35, 36.

Таблица 34 – Определение специфичности *Perlsucht – Tuberculin*

Номер морской свинки	<i>Perlsucht – Tuberculin</i> (АТК)		Эталон ППД для птиц	
	дозы, ЕД		дозы, МЕ	
	1000	40	50	2
<b>1</b>	20	13	16,5	8,5
<b>2</b>	17	14,5	19	11,5
<b>3</b>	18	14	16	12
<b>4</b>	24,5	13	17,5	9,5
<b>5</b>	20	16	17	8,5
<b>6</b>	18	15	16,5	8,5
<b>7</b>	25	18	18	10
<b>8</b>	22	16	17	12
<b>M±m</b>	20,56± 1,07	14,94± 0,60	17,19± 0,34	10,06± 0,55
<b>Специфичность - 41%</b>				
<b>Доверительный интервал 52%-191% (<math>p=0,95</math>)</b>				

Таблица 35 – Определение специфичности *tuberculine bovine HCSM*

Номер морской свинки	<i>tuberculine bovine HCSM</i>		Эталон ППД для птиц	
	дозы, ЕД		дозы, МЕ	
	1000	40	50	2
1	15,0	9,0	20,5	13,0
2	17,0	8,0	18,0	13,5
3	16,0	9,0	20,0	13,0
4	17,0	8,0	19,0	14,0
5	16,5	9,5	20,5	11,0
6	18,0	10,0	20,0	10,0
7	16,5	10,0	22,0	12,0
8	18,0	8,5	20,5	14,0
M±m	16,75± 0,36	9,0± 0,29	20,06± 0,42	12,56± 0,52
<b>Специфичность -1,17%</b>				
<b>Доверительный интервал 66%-153% (p=0,95)</b>				

Таблица 36 – Определение специфичности *Albumose freies Rinder-Tuberculin*

Номер морской свинки	<i>Albumose freies Rinder-Tuberculin</i>		Эталон ППД для птиц	
	дозы, ЕД		дозы, МЕ	
	1000	40	50	2
1	17,5	8,5	17,5	12,0
2	16,0	11,5	19,5	11,5
3	16,5	10,0	18,0	12,5
4	14,0	8,5	20,5	13,5
5	15,5	10,0	22,0	14,5
6	16,0	11,0	18,5	12,0
7	14,5	9,5	19,0	10,0
8	16,5	10,0	20,5	12,0
M±m	15,81± 0,4	9,88± 0,37	19,44± 0,53	12,25± 0,47
<b>Специфичность -1,1%</b>				
<b>Доверительный интервал 65%-155% (p=0,95)</b>				

В сравнении с параметром активность немецкий АТК, по результатам исследований характеризовался запредельно низкой специфичностью на уровне 41%, значительно превышающей граничную норму-10%. Вместе с тем полученный результат является ожидаемым, так как первоначальная технология изготовления туберкулина, предложенная Робертом Кохом, не предусматривала очистку целевого аллергена от балластных соединений. Из литературных источников известно, что данное обстоятельство явилось основанием для совершенствования технологии приготовления туберкулина.

Анализ специфичности и *tuberculine bovine HCSM* демонстрирует значение на уровне 1,17%, а *Albumose freies Rinder-Tuberculin* на уровне 1,1%.

Современный эталон ППД для млекопитающих оттитрован в отношении Международного стандарта и соответствуют 10000 МЕ/мг *PPD-bovine*, что эквивалентно *PPD-S* 50000 МЕ/мг, действующего в период производства *Albumose freies Rinder-Tuberculin* и *tuberculine bovine HCSM*. При этом используя теоретический расчет, возможно, определить специфичность. Так активность *tuberculine bovine HCSM* составляет 200 МЕ/см<sup>3</sup>, получаем выражение  $10000/200=50$ . То есть активность туберкулина от первоначального значения снизилось в 50 раз. Учитывая результаты оценки специфичности и предполагаемой линейности получается выражение:  $1,17 \times 50 = 58,5\%$ .

Аналогично проведенный расчет в отношении *Albumose freies Rinder-Tuberculin* демонстрирует следующее:  $10000/500 = 20$ . Таким образом, за период хранения активность безальбумозного туберкулина снизилась в 20 раз. Принимая во внимание результаты оценки специфичности, полученное значение составляет 1,1, а с учетом кратности снижения активности:  $1,1 \times 20 = 22\%$ , что в два раза лучше в сравнении с АТК и в три раза в сравнении с *HCSM*.

Следующим этапом исследования было определение реактогенности микобактериальных аллергенов. В соответствии современных требований (ГОСТ 32306-2013) оценка параметра реактогенность проведена на ранее не использованных морских свинках, в трех повторностях, путем внутрикожной инъекции  $\frac{1}{4}$  диагностической дозы крупного рогатого скота. Учет реакции был

осуществлен через 24 часа, после осуществления инъекции разведений, в дозе 500 МЕ/0,1 см<sup>3</sup>. Экспериментальные данные, полученные при оценке реактогенности, представлены в таблице 37.

Таблица 37 – Реактогенность микобактериальных аллергенов

№ м/св.	Препарат			
	АТК	Туберкулин <i>HCSM</i>	Безальбумозный туберкулин	Туберкулин (молекулярное фракционирование)
1	17,5	12,0	0	0
2	18,0	13,0	0	0
3	20,0	13,0	0	0

Полученные данные свидетельствуют о высокой реактогенности *Perlsucht* – *Tuberculin* и *tuberculine bovine HCSM*, а также ареактогенностью *Albumose freies Rinder-Tuberculin* и туберкулина, производимого в соответствии современной технологии (согласно требований ГОСТ 32306-2013, допустимая воспалительная реакция не должна превышать 5 мм).

Резюмируя результаты исследования видно, что по иммунобиологическим параметрам микобактериальные аллергены значительно различаются. Так в отношении АТК выявилась приемлемая для проведения аллергического исследования биологическая активность, но низкая специфичность и высокая реактогенность. Альттуберкулин для млекопитающих (АТК) при длительном хранении характеризуется стабильностью. *HCSM* туберкулин и безальбумозный туберкулин характеризовались меньшей активностью в сравнении с АТК и соответственно стабильностью.

#### 4.6. Усовершенствование комплексного аллергена из атипичных микобактерий для применения в симультанной пробе с ППД туберкулином для млекопитающих

Основным документом в Российской Федерации, используемым в практической деятельности ветеринарных специалистов определяющий диагностику туберкулёза является «Наставление по диагностике туберкулеза животных» от 2002 г. В соответствии указанного нормативного документа аллергическая дифференциальная диагностика туберкулёза крупного рогатого скота, при проявлении случаев неспецифической реакционности, осуществляется с применением туберкулина для млекопитающих и КАМ, вариантом подобного исследования может являться исследование с использованием туберкулина для млекопитающих и ППД для птиц (симультанная проба).

Указанный дуализм, в выборе туберкулина (КАМ или ППД для птиц), при осуществлении симультанного исследования обусловлен не одинаковым мнением относительно диагностической эффективности вариантов туберкулинов. В соответствии экспериментального материала одних исследователей и комплексный аллерген из нетуберкулёзных микобактерий и туберкулин для птиц обуславливают равнозначную диагностическую эффективность, при осуществлении симультанного исследования.

Исследованиями других авторов демонстрируется противоположный результат, свидетельствующий о значимо большей эффективности КАМ, в сравнении с ППД для птиц.

Вместе с тем анализ результатов лабораторных исследований демонстрирует крайне низкие значения выявления в патологическом материале от крупного рогатого скота микобактерий птичьего вида [130, 132]. Основываясь на указанном факте эффективность комплексного аллергена, при проведении симультанного исследования, значимо больше, что подтверждается исследованиями, проведенными крупными специалистами в области

аллергодиагностики животных - А.Н. Шаровым, и А.Х. Наймановым. Вместе с тем в настоящее время эффективность симультанной пробы с использованием КАМ значительно снизилась, что характеризуется в проявлении неопределенного результата. Обозначенная проблема обусловлена несколькими причинами: необходимостью наличия большого количества животных с неспецифическими реакциями, минимальное значение более 6 (групповое исследование); изменение экологии атипичных микобактерий.

Указанное является основанием для проведения работ по усовершенствованию в целом симультанной аллергической пробы. Ключевым в данной проблематике является разработка индивидуальной симультанной пробы, основанное, прежде всего на использовании усовершенствованных форм КАМ.

Из производственного технологического регламента, описывающего этапы производства комплексного аллергена из атипичных микобактерий известен состав КАМ представляющий собой смесь в равнозначной биологической активности аллергенов атипичных микобактерий: *M. intracellulare* (в соответствии классификации Раньена относится к 3 группе) и *M. scrofulaceum* (в соответствии классификации Раньена относится ко 2 группе). В свою очередь, согласно последних данных по выделению нетуберкулёзных микобактерий из патологического материала, полученного от крупного рогатого скота определено, что наиболее частым являются изоляты относящиеся к 4 группе по классификации Раньена составляющие около 60% [130, 132]. Очевидно, что отсутствие аллергенов нетуберкулёзных микобактерий относящиеся к 4 группе в рецептуре комплексного аллергена является причиной пониженной эффективности.

Принимая во внимание, перечисленное в лаборатории хронических инфекций животных ВИЭВ были проведены комплексные исследования и изготовлены усовершенствованные комплексные аллергены, классифицированные как КАМ-2 и КАМ-3.

Комплексный аллерген из нетуберкулёзных микобактерий (КАМ-2) представляет собой смесь четырех видовых аллергенов полученных при



использовании следующих нетуберкулёзных микобактерий: *M. scrofulaceum* (вторая группа по классификации Раньена), *M. intracellulerae* (третья группа по классификации Раньена), *M. fortuitum* и *M. smegmatis* (четвертая группа по классификации Раньена).

Комплексный аллерген из нетуберкулёзных микобактерий (КАМ-3) представляет собой смесь трёх видовых аллергенов, полученных при использовании следующих микобактерий: *M. avium* (третья группа по классификации Раньена), *M. scrofulaceum* (вторая группа по классификации Раньена), *M. fortuitum* (четвертая группа по классификации Раньена).

Оценку диагностических свойств изготовленных комплексных аллергенов проводили на морских свинках, сенсibilизированных атипичными микобактериями, в сравнении с классическими аллергенами: КАМ, ППД для птиц и туберкулином для млекопитающих. При проведении сравнительных исследований была использована методика изучения сенсibilизирующих свойств нетуберкулёзных микобактерий в соответствии «Наставления по диагностике туберкулеза животных» от 2002 г.

Исследования были осуществлены на морских свинках сенсibilизированных микобактериями различных видов: *M. bovis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*. Животных сенсibilизировали по пять голов каждым видом атипичных микобактерий. Морских свинок иммунизировали микобактериями, в дозе 5 мг., внутримышечно, дважды с интервалом 14 суток. Морских свинок одной группы сенсibilизировали микобактериями бычьего вида однократно внутрикожно в дозе 0,2 мг. Через 30 суток после первой инъекции микобактериями. Результаты сравнительного исследования представлены в таблице 38.

Анализируя результаты исследования, представленные в таблице видно, что комплексный аллерген КАМ-3 по параметру активность и специфичность превосходит сравниваемые аллергены.

Так материалы исследований демонстрируют, что в группе морских свинок сенсibilизированные микобактериями бычьего вида использование ППД для

птиц, КАМ, КАМ-2 характеризовались незначительной реакционностью. Вместе с тем использование КАМ-3 характеризовалась отсутствием даже незначительной реакции в указанной группы. При этом у животных сенсibilизированные микобактериями бычьего вида выявлена положительная реакция на ППД для млекопитающих.

Таблица 38 – Сравнительное изучение диагностической эффективности КАМ -3, в сравнении с другими аллергенами

№ группы	Сенсibilизация животных микобактериями	№ морской свинки,	Аллерген				
			ППД-млекоп. (5 МЕ)	ППД-птиц (10МЕ)	КАМ (10ЕД)	КАМ-2 (10 ЕД)	КАМ-3 (10 ЕД)
			Интенсивность реакции ГЗТ				
1.	<i>M. bovis</i>	1	17,5	4,5	4,0	3,5	0
		2	9,5	4,0	4,0	3,0	0
		3	9,5	4,5	4,0	2,0	0
		4	10,0	3,5	4,0	2,0	0
		5	10,0	3,5	3,5	3,0	0
2.	<i>M. scrofulaceum</i>	1	6,0	3,5	3,5	12,5	15,5
		2	7,0	8,0	3,5	12,0	18,0
		3	7,0	6,0	5,0	12,5	16,5
		4	5,0	3,0	5,5	14,5	18,0
		5	7,5	6,5	8,5	12,5	17,5
3.	<i>M. fortuitum</i>	1	4,0	8,5	7,0	13,0	13,5
		2	2,0	5,5	7,5	13,0	14,0
		3	5,5	5,0	8,5	11,0	14,5
		4	6,5	4,0	7,5	12,0	14,5
		5	5,5	4,0	7,0	9,5	12,5
4.	<i>M. intracellularae</i>	1	2,0	7,5	9,0	11,5	16,0
		2	4,5	8,0	9,5	11,5	16,5
		3	7,0	6,5	9,5	10,0	17,0
		4	5,5	6,5	6,5	9,5	13,0
		5	3,0	3,0	4,0	7,0	10,5
5.	<i>M. avium</i>	1	3,5	9,5	10,0	11,5	17,5
		2	3,5	10,0	7,5	9,5	18,5
		3	4,0	12,5	9,0	9,0	17,5
		4	2,0	10,0	10,5	10,0	19,5
		5	2,0	9,0	10,5	10,0	19,0

В группе морских свинок иммунизированных микобактериями *M. scrofulaceum* выявлена сниженная реакционность на ППД для птиц и КАМ, в то время как регистрировалась повышенная реакционность при использовании КАМ-2 и КАМ-3. При сопоставлении аллергической реакционности между аллергенами КАМ-2 и КАМ-3 выявляется преимущество последнего.

В группе морских свинок иммунизированных микобактериями *M. fortuitum* и *M. intracellulareae* выраженная пониженная реакционность на туберкулин для млекопитающих, вместе с тем реакционность КАМ была выше, в сравнении с ППД для птиц, КАМ-2 характеризовался более выраженной реакционностью в сравнении с КАМ, а КАМ-3 характеризовался более выраженной реакционностью, в сравнении с КАМ-2.

В группе животных сенсibilизированных микобактериями птичьего вида выявлено, что интенсивность аллергической реакции более выражена на КАМ-3, в сравнении с КАМ-2 и КАМ.

Также из представленных сравнительных результатов исследования видно, что нетуберкулёзные микобактерии: *M. intracellulareae*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum* и *M. smegmatis*, характеризуются наибольшей сенсibilизирующей способностью. Данное обстоятельство является обоснованием использования указанных микобактерий для изготовления комплексного аллергена.

Следующим этапом исследования было изучение стабильности комплексного аллергена из атипичных микобактерий – КАМ-3. Результаты сравнительного исследования представлены в таблице 39.

Таблица 39- Стабильность комплексного аллергена из атипичных микобактерий

#### КАМ-3

Параметры стабильности	Период исследования, месяцы								
	П.и.	3	6	9	12	18	24	30	36
рН	7,21	7,20	7,20	7,20	7,20	7,20	7,20	7,20	7,20
Содержание белка, мг/мл	0,99	0,98	0,99	0,97	0,98	0,98	0,97	0,99	0,98

**Примечание:**\*П.и.- после изготовления

Оценку стабильности аллергена очищенного из атипичных микобактерий КАМ-3 осуществляли по параметрам: концентрация водородных ионов (рН) и содержанию белка в мл. стандартного раствора [274, 275]. Выбор указанных критериев обусловлен тем, что туберкулин контактирует со стеклом флакона и резиновой пробкой, при этом указанные поверхности могут влиять на рН (защелачивать или закислять раствор). При этом возможно осаждение белка и

соответственно снижению его в растворе аллергена. Также известно, что параметр концентрация белка в максимальных значениях коррелирует с параметром активность.

Оценку стабильности осуществляли при установленном температурном режиме хранения- 2-8° С в течение первого года, с интервалом три месяца, в течение второго и третьего года хранения, с интервалом 6 месяцев.

Результаты оценки рН в период хранения демонстрирует значение 7,21 – 7,20, что характеризует лекарственную форму как стабильную. Оценка содержания белка в растворе комплексного аллергена характеризуется колебанием от 0,99 до 0,97 связанное с ожидаемой погрешностью методики.

Таким образом, результаты сравнительных исследований демонстрируют, что комплексный аллерген КАМ-3 по диагностическим параметрам значимо превосходит ППД для птиц, и различные варианты комплексных аллергенов. Также сравнительные исследования демонстрируют, что наибольшими сенсibiliзирующими свойствами характеризуются нетуберкулёзные микобактерии: *M. intracellularae*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum* и *M. smegmatis*, относящиеся ко 2, 3 и 4 группам по классификации Раньена, которые необходимо использовать при изготовлении комплексного аллергена для проведения симультанной пробы.

Комплексный аллерген из атипичных микобактерий КАМ-3 характеризуется высокой стабильностью.

#### 4.6.1. Разработка технологии изготовления комплексного аллергена «Параавиум» и методик оценки его активности и специфичности

При аллергической диагностике паратуберкулеза, различные авторы использовали либо ионин (паратуберкулин), изготовленный из микобактерий паратуберкулеза, либо туберкулины для птиц, изготовленные только из микобактерий туберкулеза птичьего вида [130].

Некоторые авторы указывают, что ППД для птиц, вследствие достаточно высокой видовой специфичности эффективен при исследовании животных, сенсibilизированных микобактериями комплекса авиум-интрацеллюляре. При инфицировании животных другими видами микобактерий, дифференцирующие свойства этого аллергена понижаются.

Значимое повышение диагностической эффективности аллергена может быть осуществлено путем получения антигенного коктейля из аллергенов различных видов микобактерий (являющиеся наиболее частой причиной сенсibilизации) [343, 344, 361].

Изложенное, является обоснованием для конструирования нового комплексного аллергена для аллергической диагностики паратуберкулеза. Тем более, что в доступной литературе имеются противоречивые сведения о диагностической ценности моновидовых аллергенов, изготовленных только из микобактерий птичьего вида или микобактерий паратуберкулеза.

Первоначально была разработана технология изготовления комплексного аллергена, основу которой составляла технология получения ППД для птиц. Технологические этапы представлены ниже.

### **Технологические этапы изготовления комплексного аллергена**

#### **«Параавиум»**

Для изготовления комплексного аллергена, используемого при диагностике паратуберкулеза мы использовали туберкулиногенный штамм микобактерий птичьего вида *M. avium* № 22-82 и штамм микобактерий паратуберкулеза *M. avium subs. paratuberculosis* №19698 ATCC. Каждый из штаммов культивировали на глицериново-картофельной среде в пробирках Ру. Для получения комплексного аллергена для диагностики паратуберкулеза проводили последовательную адаптацию микобактерий птичьего вида к синтетической питательной среде, следующего состава:

1. Аспарагин- 5,0 гр.
2. Аммоний лимоннокислый двузамещенный – 2,0 гр.
3. Калий фосфорнокислый двузамещенный – 5,0 гр.

4. Магний сернокислый – 0,5 гр.
5. Железо сернокислое закисное -0,05 гр.
6. Глицерин – 50 мл.
7. Лимонная кислота - 4,0 гр.
8. Цинк сернокислый – 0,1 гр.
9. Дистиллированная вода до 1000 мл.

Выбор указанной питательной среды обусловлен её многолетним использованием, при изготовлении микобактериальных аллергенов, что характеризует её оптимальный сбалансированный состав. Технологические этапы получения Параавиум представлены ниже.

1. Периодичность пересева микобактерий *M. avium* штамм №22-82 и *M. avium subs. paratuberculosis*, штамм 19698 ATCC на глицериново-картофельной среде, при температуре 39-40°C, составила 2-3 месяца, период накопления биомассы- 10-20 суток.

Указанные параметры культивирования и пересева отработаны при лабораторном и промышленном изготовлении микобактериальных аллергенов.

2. Адаптация микобактерий *M. avium* штамм №22-82 и *M. avium subs. paratuberculosis*, штамм 19698 ATCC с глицериново-картофельной среды на синтетическую питательную среду.

3. Выращивание адаптированной культуры *M. avium* штамм №2282/ *M. avium subs. paratuberculosis*, штамм 19698 ATCC на синтетической питательной среде, в течение 50-55 суток, при температуре 39-40°C.

4. Стерилизация посевов в течение 30 минут, при температуре 120 °С.  
(после накопления микобактериальной биомассы)

5. Фильтрация через фильтр полотно КФ от бактериальной массы.
6. Осаждение из КФ ТП 50% р-р. ТХУ при перемешивании.
7. Отстаивание ТП в течение 16-18 часов при температуре 4-6°C.
8. Удаление надосадочной жидкости.
9. Центрифугирование осадка ТП при 2500-3000 об. /мин., 20-25 минут.
10. Удаление надосадочной жидкости.

11. Растворение осадка р-ра. ТП в дистиллированной воде из расчета 1:5.
12. Подщелачивание р-ра. ТП 10% раствором нашатырного спирта до рН 7,2-7,4.
13. Подкисление р-ра. ТП 10% уксусной кислоты до рН 4,0-5,0.
14. Смешивание р-ра. ТП с равным количеством насыщенного раствора серноокислого аммония.
15. Отстаивание р-ра. ТП 16-18 часов при температуре 4-6°C.
16. Центрифугирование р-ра. ТП при 3000 об./мин., 20-30 минут.
17. Удаление надосадка.
18. Растворение осадка ТП в дистиллированной воде в соотношении 1:5.
19. Подщелачивание р-ра. ТП 10% раствором нашатырного спирта до рН 7,4-7,6.
20. Диализ р-ра. ТП в проточной воде в течение 4 суток.
21. Подщелачивание р-ра. ТП 10% раствором нашатырного спирта до рН 7,2-7,4.
22. Центрифугирование р-ра. ТП при 3000 об. /мин., 30 минут.
23. Стерильная фильтрация.
24. Определение концентрации белка р-ра. ТП.
25. Определение содержания МЕ р-ра. ТП.
26. Приготовление раствора аллергена на РМА до 25000 МЕ/см<sup>3</sup>.
27. Смешивание р-ра. ТП *M. avium* (25000 МЕ/см<sup>3</sup>) и р-ра. ТП *M. avium subs. paratuberculosis* (25000 МЕ/см<sup>3</sup>).
28. Стерильная фильтрация.
29. Стерильная фасовка в стерильную первичную упаковку, закатка, этикетировка.

При изготовлении комплексного аллергена осаждение микобактериальных белков осуществлено дважды: ТХУ (первый раз) и серноокислым аммонием (второй раз). Указанный подход является целесообразным, в связи с получением более чистого аллергена (в наибольшей степени происходит концентрация микобактериальных белков).

Изготовленный комплексный аллерген тестировали на стерильность (использованы питательные среды: мясопептонный агар, мясопептонный бульон, мясопептонный печеночный бульон, Сабуро, Тиоглекоская, ФАСТ-3Л), активность, специфичность и реактогенные свойства. Высев на питательные среды характеризовал препарат как стерильный. Учитывая гомологичность комплексного аллергена микобактериям птичьего вида, оценка активности осуществлялась на животных сенсibilизированных микобактериями птичьего вида. Результаты исследования отображает таблица 40.

Таблица 40 – Определение биологической активности комплексного аллергена «Параавиум»

Номер морской свинки	Параавиум			Эталон ППД для птиц		
	Предполагаемые дозы			дозы, МЕ		
	(125ЕД)	(25ЕД)	(5ЕД)	(125МЕ)	(25 МЕ)	(5 МЕ)
<b>1</b>	19	16	11	17	14	11
<b>2</b>	17	14	10	16,5	15,5	10
<b>3</b>	18,5	13,5	14	18,5	16	12
<b>4</b>	18,5	14	11	17,5	15	11,5
<b>5</b>	17,5	14,5	11,5	18	16,5	13
<b>6</b>	17,5	12,5	8,5	15	12,5	9,5
<b>7</b>	18,5	15,5	10	18,5	15,5	10
<b>8</b>	17,5	14	10	18	13	8,5
<b>9</b>	17,5	13,5	11,5	18,5	14,5	11
<b>M±m</b>	17,94± 0,23	14,17± 0,35	10,83± 0,51	17,50± 0,39	14,72± 0,45	10,72± 0,46
<b>Содержание МЕ/см<sup>3</sup> раствора = 25000</b>						
<b>Доверительный интервал 74-135% (p=0,95)</b>						

Табличные данные характеризуют параметр биологическая активность комплексного аллергена аналогичную номинальной контролю ППД для птиц, и предполагает оценку активности на морских свинках, сенсibilизированных микобактериями птичьего вида.

Принимая во внимание гетерологичность комплексного аллергена микобактериям бычьего вида, специфичность была определена на лабораторных животных, иммунизированных авирулентными микобактериями бычьего вида. Результаты оценки специфичности комплексного аллергена представлены в таблице 41.



Оценка специфичности комплексного аллергена «Параавиум» продемонстрировало значение равное 3,6%, что соответствует требованиям МЭБ (до 10%). Таким образом, указанный подход также может быть использован в дальнейшем для оценки специфичности комплексного аллергена.

Таблица 41 – Определение специфичности комплексного аллергена «Параавиум»

Номер морской свинки	Параавиум		Эталон ППД для млекопитающих	
	Предполагаемые дозы		дозы, МЕ	
	(500ЕД)	(20ЕД)	(25 МЕ)	(1 МЕ)
1	17	12,5	18,5	13
2	18	10,5	17,5	10
3	18,5	8,5	20	14
4	19	9	17,5	11
5	20,5	9	17	12,5
6	15,5	12	18,5	13
7	17,5	10	14,5	8,5
8	17	9,5	15,5	11,5
9	19,5	11	20,5	13
10	19,5	9,5	19	13
M±m	18,2± 0,47	10,15± 0,42	17,85± 0,59	11,95± 0,53
<b>Специфичность – 3,6%</b>				
<b>Доверительный интервал 63%-159% (p=0,95)</b>				

Последующая оценка реактогенности препарата продемонстрировала его ареактогенность.

Следующим этапом исследования было изучение стабильности комплексного аллергена «Параавиум». Результаты исследования представлены в таблице 42.

Таблица 42 – Стабильность комплексного аллергена «Параавиум»

Параметры стабильности	Период исследования, месяцы								
	П.и.	3	6	9	12	18	24	30	36
рН	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Содержание белка, мг/мл	0,55	0,54	0,54	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55

**Примечание:**\*П.и.- после изготовления

Оценку стабильности комплексного аллергена «Параавиум» осуществляли по параметрам: концентрация водородных ионов (рН) и содержанию белка в мл. стандартного раствора [274, 275, 401], при установленном температурном режиме

хранения- 2-8°C в течение первого года с интервалом три месяца, в течение второго и третьего года хранения, с интервалом 6 месяцев.

Результаты оценки рН в период хранения демонстрирует значение 7,0, что характеризует стабильность лекарственной формы. Оценка содержания белка в растворе туберкулина «Параавиум» характеризуется колебанием от 0,55 до 0,54 связанное с ожидаемой погрешностью методики. Полученные значения характеризуют стабильность комплексного аллергена «Параавиум» в период исследования.

Таким образом, разработана технология изготовления комплексного аллергена «Параавиум» и отработаны методики оценки активности, специфичности и реактогенности, в соответствии международных требований. Комплексный аллерген характеризуется высокой стабильностью.

4.6.2. Разработка биологической модели воспроизведения ГЗТ на морских свинках, усилением сенсibiliзирующих свойств микобактерий для дифференциации *M. avium subsp. paratuberculosis* от других видов микобактерий

Паратуберкулёзная инфекция, не смотря на то, что возбудитель идентифицирован более 100 лет назад является мало изученной [18].

Основными трудностями при установлении диагноза паратуберкулёза животных являются: не совершенные методики изоляции возбудителя; не сбалансированный состав питательных сред; пониженная чувствительность и специфичность диагностических методик; отсутствие модели инфекции. Многочисленные исследования по воспроизведению паратуберкулёзной инфекции не позволили создать модель инфекционного процесса [18, 47, 128].

Поэтому нами была поставлена задача разработать биологическую модель ГЗТ, при паратуберкулёзной инфекции.

Известен способ оценки сенсibiliзирующих свойств атипичных микобактерий, являющийся прототипом предлагаемого способа, включающий

введение атипичных микобактерий подкожно двум морским свинкам в дозе 1 мг/мл. Спустя 21-30 дней, морских свинок исследуют симультанной аллергической пробой с КАМ 10 ЕД. и ППД туберкулина для млекопитающих в дозе 25 ТЕ (что соответствует дозе выраженной в эквивалентных единицах активности международного стандарта используемого в настоящее время 5 МЕ).

Разведения аллергенов вводят внутрикожно с двух сторон, в депилированные участки кожи, на боках животного. Реакцию учитывают через 24-48 часов. Положительная реакция проявляется гиперемией кожи и образованием припухлости диаметром 5 мм. или более, иногда с некрозом в центре. Обнаружение реакции на один или оба препарата, свидетельствует о сенсibiliзирующих свойствах изучаемой культуры атипичных микобактерий [113].

Недостатком этого способа сенсibiliзации является низкая сенсibiliзирующая способность нетуберкулёзных микобактерий для морских свинок (кроме микобактерий относящиеся к патогенным видам *M. bovis* и *M. tuberculosis*). Поэтому необходимо усилить сенсibiliзацию животных различными видами микобактерий, в том числе и непатогенными для морских свинок микобактериями паратуберкулеза.

Для этого в лаборатории хронических инфекций на среде Левенштейна - Йенсена были выращены 5 культур микобактерий: *M. bovis* БЦЖ, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. paratuberculosis* в течение 35 суток, при температуре 37°C. По истечении указанного времени с поверхности питательной среды культуры микобактерий в количестве по 5 мг из расчета на одну морскую свинку вносили в отдельные стерильные пластиковые пробирки. В пробирки добавили адьювант (15 частей ланолина и 85 частей минерального масла) из расчета 0,5 см<sup>3</sup> адьюванта на 5 мг. микобактерий.

Полученные варианты культур микобактерий и адьюванта гомогенизировали и инъецировали подкожно в четыре места (2 в область холки и 2 в области крестца) морским свинкам, массой 300-350 гр.

Через 30 суток, после введения микобактерий, в составе адьюванта, морским свинкам на боковых поверхностях брюшка справа и слева депилировали шерсть и внутрикожно инъецировали микобактериальные туберкулины. Результаты исследований оценивали спустя 24 часа, после введения аллергенов.

Исследования были осуществлены в трех сериях опытов.

1) Пять групп морских свинок, сенсibilизированных 5 видами микобактерий в адьюванте. Оценку иммунологической реактивности сенсibilизированных морских свинок проводили симультанной пробой с комплексным аллергеном из атипичных микобактерий и туберкулином для млекопитающих. Результаты исследований представлены в таблице 43.

Из таблицы 43 видно, что в первой группе морских свинок, сенсibilизированных *M. avium*, максимальная интенсивность кожной реакции ГЗТ у животных выявлена на КАМ, чем на ППД для млекопитающих.

Во второй группе морских свинок, иммунизированных авирулентными микобактериями туберкулёза бычьего вида, максимальная интенсивность кожной реакции ГЗТ выявлена на ППД для млекопитающих, чем на КАМ.

В третьей группе морских свинок, сенсibilизированных *M. avium subsp. paratuberculosis*, большая интенсивность аллергических реакций ГЗТ выявлена у животных на КАМ, чем на ППД для млекопитающих.

В четвертой группе лабораторных животных, которым инъецировали *M. scrofulaceum*, и в пятой группе опытных животных, которым инъецировали *M. fortuitum*, большая интенсивность аллергических реакций ГЗТ выявлена также на КАМ, чем на ППД для млекопитающих.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что подкожный метод сенсibilизации морских свинок различными культурами микобактерий, в адьюванте усиливает выраженность аллергической реакции, на соответствующие разведения туберкулинов. Ответная реакция ГЗТ специфична, так как зараженные *M. bovis* животные реагируют с большей интенсивностью реакций ГЗТ на аллерген для млекопитающих, а морские свинки, иммунизированные нетуберкулёзными

микобактериями характеризуются выраженностью аллергической реакции на комплексный аллерген из атипичных микобактерий.

Таблица 43 – Исследование сенсibilизированных морских свинок ППД для млекопитающих и КАМ

Группа 1 сенсibilизация <i>M. avium</i>		
№№ м/св.	Аллергены	
	ППД для млекопитающих	КАМ
1.	12	13
2.	8	12
3.	9	13
4.	10	14
5.	9	15
Ср.зн.	9,6	13,4
Группа 2 сенсibilизация <i>M. bovis</i> БЦЖ		
№№ м/св.	Аллергены	
	ППД для млекопитающих	КАМ
1.	22	10
2.	21	11
3.	20	12
4.	19	10
5.	18	14
Ср.зн.	20	11,4
Группа 3 сенсibilизация <i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>		
№№ м/св.	Аллергены	
	ППД для млекопитающих	КАМ
1.	8	10
2.	9	15
3.	8	14
4.	10	12
5.	8	15
Ср.зн.	8,6	13,2
Группа 4 сенсibilизация <i>M. scrofulaceum</i>		
№№ м/св.	Аллергены	
	ППД для млекопитающих	КАМ
1.	8	17
2.	10	18
3.	13	17
4.	11	17
5.	13	19
Ср.зн.	11	17,6
Группа 5 сенсibilизация <i>M. fortuitum</i>		
№№ м/св.	Аллергены	
	ППД для млекопитающих	КАМ
1.	10	14
2.	11	15
3.	12	16
4.	13	16
5.	11	13
Ср.зн.	11,4	14,8

Во второй серии опытов в пяти экспериментальных группах морских свинок иммунизированных различными микобактериями (*M. avium*, *M. bovis*, *M. avium subsp. paratuberculosis*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*) с адьювантом, оценку иммунологической реактивности морских свинок осуществляли, используя ППД для млекопитающих – 5 МЕ, ППД для птиц – 5 МЕ и комплексный аллерген Параавиум – 5 ЕД. Результаты исследований представлены в таблице 44.

Из данных таблицы 44 видно, что в первой группе морских свинок, которые были сенсibilизированы *M. avium*, максимальная интенсивность кожной реакции ГЗТ у животных выявлена на очищенный туберкулин для птиц, что свидетельствует о большей сенсibilизации *M. avium* и специфичности ППД для птиц.

Во второй группе морских свинок, которым инъецировали *M. bovis* БЦЖ, максимальная интенсивность кожной реакции ГЗТ у животных выявлена на аллерген для млекопитающих, что свидетельствует о большей сенсibilизации *M. bovis* и специфичности ППД для млекопитающих.

В третьей группе морских свинок, которым инъецировали *M. avium subsp. paratuberculosis*, максимальная интенсивность кожной реакции ГЗТ у животных выявлена на комплексный аллерген Параавиум, что свидетельствует о большей сенсibilизации *M. avium subsp. paratuberculosis* и специфичности Параавиум.

В четвертой и пятой группах морских свинок, которым подкожно вводили атипичные микобактерии *M. scrofulaceum* и *M. fortuitum*, максимальная интенсивность кожной реакции ГЗТ не выявлена ни на один аллерген, что свидетельствует о гетерологичности используемых аллергенов в отношении исследуемых культур микобактерий.

Так, интенсивность аллергических реакций составила в среднем: на ППД для млекопитающих 11,3 мм., на ППД для птиц 9,4-13,8 мм., на Параавиум 10,6-13,7 мм. Тем не менее, проявление интенсивности реакций у сенсibilизированных атипичными микобактериями животных было выше на ППД для птиц и Параавиум.

Таблица 44 – Исследование сенсibilизированных морских свинок с туберкулином для млекопитающих, туберкулином для птиц и Парааивиум

Группа 1 сенсibilизация <i>M. avium</i>			
№№ м/св.	Аллергены		
	ППД для млекопитающих	ППД для птиц	Комплексный аллерген Парааивиум
1.	10	15,5	11,5
2.	6,5	11	10
3.	10,5	16	14
4.	12,5	16	15
5.	8	13	14
Ср. зн.	9,5	14,3	12,9
Группа 2 сенсibilизация <i>M. bovis</i> БЦЖ			
№№ м/св.	Аллергены		
	ППД для млекопитающих	ППД для птиц	Комплексный аллерген Парааивиум
1.	21,5	9	7,5
2.	20	10,5	9
3.	23,5	12,5	11,5
4.	23	6	6,5
5.	21	15	15,5
Ср. зн.	21,8	10,6	10,0
Группа 3 сенсibilизация <i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>			
№№ м/св.	Аллергены		
	ППД для млекопитающих	ППД для птиц	Комплексный аллерген Парааивиум
1.	7	8,5	15
2.	8	8	17
3.	7,5	10	18
4.	9,5	10	16
5.	8,5	11	18
Ср. зн.	8,1	9,5	16,8
Группа 4 сенсibilизация <i>M. scrofulaceum</i>			
№№ м/св.	Аллергены		
	ППД для млекопитающих	ППД для птиц	Комплексный аллерген Парааивиум
1.	7	11	8,5
2.	14,5	12	11
3.	12,5	13,5	11,5
4.	12	0	10
5.	10,5	10,5	12
Ср. зн.	11,3	9,4	10,6
Группа 5 сенсibilизация <i>M. fortuitum</i>			
№№ м/св.	Аллергены		
	ППД для млекопитающих	ППД для птиц	Комплексный аллерген Парааивиум
1.	9	11,5	13,5
2.	12	13,5	15
3.	9	13,5	13
4.	14,5	16	13
5.	12	14,5	14
Ср. зн.	11,3	13,8	13,7

Представленные данные таблицы доказывают, что животные, которым вводили *M. avium subsp. paratuberculosis*, характеризовались реакционностью на комплексный аллерген Параавиум реакцией 15-18 мм. (в среднем 16,8 мм.), на аллерген для птиц 8-11 мм. (в среднем 9,5 мм.), на туберкулин для млекопитающих 7-9,5 мм. (в среднем 8,1 мм.), то есть комплексный аллерген Параавиум обладает большей специфичностью, в сопоставлении с туберкулином очищенным для птиц и комплексным аллергеном из нетуберкулёзных микобактерий при оценке лабораторных морских свинок, иммунизированных *M. avium subsp. paratuberculosis*.

В третьей повторной серии опытов пять групп морских свинок сенсibilизировали *M. avium*, *M. bovis*, *M. avium subsp. paratuberculosis*, *M. scrofulaceum*, *M. smegmatis* с адьювантом, оценку иммунологической реактивности морских свинок осуществляли, используя ППД для млекопитающих – 5 МЕ, ППД для птиц – 5 МЕ и комплексный аллерген Параавиум – 5 ЕД. Результаты исследований представлены в таблице 45.

Из таблицы 45 видно, что в первой группе морских свинок, сенсibilизированных *M. avium*, наибольшая интенсивность кожной реакции ГЗТ определена на аллерген для птиц, что характеризует большую сенсibilизацию *M. avium* и специфичность ППД для птиц.

Во второй группе лабораторных морских свинок, иммунизированных авирулентными микобактериями *M. bovis*, максимальная интенсивность кожной реакции ГЗТ у животных выявлена на аллерген для млекопитающих, что свидетельствует о большей сенсibilизации *M. bovis* и специфичности ППД для млекопитающих.

В третьей группе морских свинок, которым инъецировали *M. avium subsp. paratuberculosis*, максимальная интенсивность кожной реакции ГЗТ у животных выявлена на комплексный аллерген Параавиум, что свидетельствует о большей сенсibilизации микобактериями паратуберкулёза и специфичности Параавиум.



Таблица 45 – Исследование сенсibilизированных морских свинок с туберкулином для млекопитающих, туберкулином для птиц и Параавиум

Группа 1 сенсibilизация <i>M. avium</i>			
№№ м/св.	Аллергены/дозы		
	ППД для млекопитающих/ 5 МЕ	ППД для птиц/ 5 МЕ	Комплексный аллерген Параавиум / 5 ЕД
1.	13	16,5	10
2.	12	14	11,5
3.	9,5	15,5	12
4.	10,5	17	14
5.	11	14	12
Ср. зн.	11,2	15,4	11,9
Группа 2 сенсibilизация <i>M. bovis</i>			
№№ м/св.	Аллергены/дозы		
	ППД для млекопитающих/ 5 МЕ	ППД для птиц/ 5 МЕ	Комплексный аллерген Параавиум /5 ЕД
1.	22	10,5	8,5
2.	20,5	12,5	10
3.	24	10	11
4.	22,5	9,5	10
5.	18,5	8,5	7,0
Ср. зн.	21,5	10,2	9,3
Группа 3 сенсibilизация <i>M. avium subsp.paratuberculosis</i>			
№№ м/св.	Аллергены/дозы		
	ППД для млекопитающих/ 5 МЕ	ППД для птиц/ 5 МЕ	Комплексный аллерген Параавиум /5 ЕД
1.	8	10	18
2.	6,5	10,5	20
3.	7,5	12	19,5
4.	9	9,5	19
5.	9	9,5	18,5
Ср. зн.	8	10,3	19
Группа 4 сенсibilизация <i>M. scrofulaceum</i>			
№№ м/св.	Аллергены/дозы		
	ППД для млекопитающих/ 5 МЕ	ППД для птиц/ 5 МЕ	Комплексный аллерген Параавиум /5 ЕД
1.	10,0	9,5	10
2.	11	8,5	11,5
3.	10,5	10	12
4.	9,5	9	10,5
5.	8,5	8,5	12
Ср. зн.	9,9	9,1	11,2
Группа 5 сенсibilизация <i>M. smegmatis</i>			
№№ м/св.	Аллергены/дозы		
	ППД для млекопитающих/ 5 МЕ	ППД для птиц/ 5 МЕ	Комплексный аллерген Параавиум /5 ЕД
1.	9,5	12	13
2.	12,5	13,5	14,5
3.	10,5	14	14,5
4.	10	14,5	12,5
5.	11,5	12,5	14,5
Ср. зн.	10,8	13,3	13,8

В четвертой и пятой группах морских свинок, которым подкожно вводили атипичные микобактерии *M. scrofulaceum* и *M. smegmatis*, максимальная интенсивность кожной реакции ГЗТ не выявлена ни на один аллерген, что свидетельствует о гетерологичности используемых аллергенов в отношении исследуемых культур микобактерий.

Так, интенсивность аллергических реакций составила в среднем: на ППД для млекопитающих 9,9 и 10,8 мм. соответственно, на ППД для птиц 9,4-13,8 мм., на Параавиум 9,1-13,3 мм.

Представленные данные таблиц доказывают, что группа морских свинок, сенсibilизированная *M. avium subsp. paratuberculosis*, реагировала на комплексный аллерген Параавиум реакцией 18-20 мм. (в среднем 19 мм.), на ППД для птиц 9,5-12 мм (в среднем 10,3 мм), на аллерген для млекопитающих 6,5-9,0 мм. (в среднем 19,0 мм.), таким образом, комплексный аллерген Параавиум обладает большей специфичностью, в сравнении с очищенным туберкулином для птиц и комплексным аллергеном из атипичных микобактерий, при исследовании сенсibilизированных *M. avium subsp. paratuberculosis* морских свинок.

Проявление кожной реакции ГЗТ на микобактериальные аллергены свидетельствует о сенсibilизирующих свойствах изучаемых культур и принадлежности их к роду микобактерий. Большая интенсивность аллергических реакций на очищенный туберкулин для птиц свидетельствует о принадлежности культуры микобактерий к *M. avium subsp. paratuberculosis*.

Конечным результатом использованного метода является повышение эффективности лабораторной диагностики паратуберкулёза способом усиления сенсibilизации микобактериями аллергической реактивности морских свинок, позволяющей по интенсивности проявления аллергических реакций ГЗТ у сенсibilизированных морских свинок проводить дифференциацию микобактерий паратуберкулёза от других видов родственных микобактерий.

При этом аллергические исследования сенсibilизированных морских свинок можно проводить в симультанной пробе с микобактериальными аллергенами:

- 1.Туберкулином для млекопитающих и туберкулином для птиц;
- 2.Туберкулином для млекопитающих и комплексным аллергеном из атипичных микобактерий;
- 3.Туберкулином для млекопитающих и Параавиум.

Из результатов исследований, очевидно, что при дифференциации *M. avium subsp. paratuberculosis* целесообразно применять симультанную пробу с ППД туберкулином для млекопитающих и Параавиум. При дифференциации *M. avium* следует использовать симультанную пробу с ППД туберкулином для млекопитающих и ППД для птиц. При дифференциации атипичных микобактерий целесообразно использовать симультанную пробу с ППД туберкулином для млекопитающих и КАМ. При необходимости дифференциации *M. avium* от *M. avium subsp. paratuberculosis* следует использовать одновременное внутрикожное введение ППД для птиц и Параавиум.

Известно, что при проведении дифференциально-диагностических исследований на микобактериальные инфекции посредством использования симультанной пробы важно не численность реагирующих особей, но интенсивность кожной туберкулиновой реакции на тот или иной аллерген. При этом выявленная реакционность на микобактериальный аллерген характеризует сенсibilизирующую способность изучаемой культуры.

Максимальная интенсивность проявления кожной реакции ГЗТ на Параавиум в сравнении с ППД для птиц и ППД для млекопитающих у сенсibilизированных морских свинок свидетельствует о принадлежности изучаемой культуры к *M. avium subsp. paratuberculosis*.

Таким образом, разработана биологическая модель воспроизведения ГЗТ на морских свинках, позволяющая методом усиления и пролонгации сенсibilизации, по интенсивности проявления аллергических реакций ГЗТ на разные микобактериальные антигены дифференцировать *M. avium subsp. paratuberculosis* от других видов микобактерий. Предложенный метод прост в исполнении, более информативен и главное может использоваться как вспомогательный тест при паратуберкулёзе животных.

## 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Оценка биологических критериев микобактериальных аллергенов в лабораторных условиях, а также лабораторная диагностика микобактериальных инфекций, на морских свинках состоит из: подготовительных этапов; и этапов постановки теста [30, 31, 32].

Подготовительные этапы включают: 1) выращивание микобактерий в период не менее 20-30 суток; 2) приготовление микобактериальной суспензии; 3) сенсibilизацию морских свинок.

При этом в период от введения микобактерий, и до использования морских свинок, проходит около 30 суток, что обусловлено формированием иммунологической реактивности [42, 133, 135]. Таким образом, длительность подготовительных этапов составит не менее 60 суток, что предполагает долгосрочное планирование.

Этапы постановки тестов реализуются в течение 3-х суток и предполагают: 1) за 24 часа до инъекции разведений туберкулинов механическую [28, 30, 33] или химическую [136] депиляцию шерсти; 2) приготовление разведений исследуемого и контрольного туберкулинов; 3) внутрикожная инъекция разведений, в соответствии латинского квадрата (полного [31, 34] или неполного [322]). 4) учет интенсивности кожной реакции ГЗТ, на разведения тестируемого и контрольного препаратов.

Критическими моментами, при осуществлении биологических тестов, значимо влияющие на результаты оценки биологических характеристик туберкулиновых аллергенов опосредованы этапами подготовки теста и этапами непосредственного тестирования [294].

Так на подготовительных этапах критическими являются: сенсibilизация морских свинок, а на этапах постановки тестов значимыми являются: подбор эквивалентной животной модели, а также её стандартизация; определение оптимального времени оценки кожной реакции ГЗТ, у сенсibilизированных

морских свинок; определение кратности использования сенсibilизированных морских свинок; использование эквивалентных дозировок микобактериальных аллергенов; определение границ (с приемлемой погрешностью) воспалительного процесса в месте введения микобактериальных аллергенов; статистическая обработка результатов анализа.

Совокупность вариантов сенсibilизации морских свинок можно классифицировать в 3 группы: живыми патогенными микобактериями; живыми аттенуированными микобактериями; инактивированными микобактериями [62]. При этом проведенные исследования продемонстрировали, что значимое влияние на результат оценки биологических параметров также оказывает доза микобактерий и путь введения в организм лабораторных животных. Так согласно литературным данным в сравнении с внутримышечным, внутрикожный способ введения микобактерий более чувствительный [92].

При этом для сенсibilизации морских свинок микобактериями *M. bovis* и *M. tuberculosis*, достаточно несколько микобактериальных клеток [43, 136], вместе с тем, при использовании нетуберкулёзных микобактерий (учитывая их низкую сенсibilизирующую способность), дозировка должна быть значимо больше [7, 15, 16].

Использование инактивированных микобактерий обусловлено следующими преимуществами:

1. Длительность сохранения сенсibilизирующих свойств в высушенном состоянии.
2. Отсутствие вирулентности.
3. Отсутствие необходимой категоричности вивария.

Основным недостатком при использовании инактивированных микобактерий является: пониженная сенсibilизирующая способность, в сравнении с живыми микобактериями, что предполагает использование адьюванта [93]. Причиной пониженной сенсibilизирующей способности инактивированных микобактерий является повышенная элиминация

микобактериальных антигенов из организма, вследствие отсутствия репликации микобактерий [240, 243, 367].

Использование живых микобактерий характеризуются следующими преимуществами: 1) репликативная активность в клетках макрофагального ряда; 2) повышенная сенсibiliзирующая способность в минимальных дозах, в сравнении с инактивированными микобактериями.

В свою очередь использование живых микобактерий сопряжено со следующими проблемами:

1) необходимостью систематического пересева на питательных средах, консервированные в условиях пониженных температур, либо сублимация [3].

2) приготовления микобактериальной суспензии в лабораторных условиях соответствующего класса чистоты [33].

3) поддержания соответствующей категоричности вивария.

Подбор оптимальных вариантов сенсibiliзации обусловлен тем, что микобактерии производственных штаммов, используемые для приготовления микобактериальных аллергенов, могут мутировать [3, 51, 246], что в свою очередь может быть причиной выпуска туберкулина со сниженными диагностическими характеристиками.

В соответствии доступных литературных источников предпочтительность использования микобактерий различной степени вирулентности или инактивированных микобактерий не регламентирована, что позволяет использовать любой из указанных вариантов.

Выше изложенное позволяет характеризовать не равнозначность вариантов иммунизации лабораторных морских свинок живыми и инактивированными микобактериями.

В соответствии литературных данных при повышении дозы и кратности введения микобактерий возможно развитие иммунодепрессорного эффекта.

Поэтому варианты, предполагающие введение наименьшего количества микобактерий, характеризуется минимальной вероятностью негативного влияния

на организм морских свинок, но при этом они должны обеспечивать чувствительность на уровне единицы активности гомологичного аллергена.

Анализ результатов диссертационного исследования, а также литературных источников позволяет характеризовать варианты сенсибилизации морских свинок следующими критериями: иммуногенность, чувствительность и специфичность. При этом чувствительность следует понимать, как способность варианта сенсибилизации выявлять состояние ГЗТ при использовании дозы (или одной из доз) аллергена равной 1 единицы и выше [62, 262, 274].

В свою очередь специфичность - это способность варианта сенсибилизации обуславливать реакционность на дозы гомологичного туберкулина и её отсутствие (или минимальная выраженность) при инъекции гетерологичного аллергена выраженные в процентном отношении.

Исследованиями по определению оптимального способа иммунизации животных авирулентными бычьими микобактериями, обеспечивающим оптимальное соотношение чувствительности и специфичности, приемлемое для оценки биологических характеристик туберкулиновых аллергенов продемонстрировано, что указанным требованиям соответствует вариант, предполагающий внутрикожное введение авирулентных *M. bovis* штамм БЦЖ в дозе 0,2 мг.

В соответствии современных требований [34, 62, 216] для оценки параметра биологическая активность туберкулиновых аллергенов могут быть использованы лабораторные морские свинки иммунизированные микобактериями тех видов, из которых приготовлены аллергены. Вместе с тем параметр специфичность туберкулинов может быть оценена на иммунизированных гетерологичными микобактериями морских свинок. Например, для птичьего туберкулина это микобактерии бычьего вида, в отношении ППД для млекопитающих это микобактерии птичьего вида [274, 275], в отношении КАМ это микобактерии бычьего вида [7, 205].

Исследования сенсибилизирующих свойств комплекса *M. avium-intracellulae* и различных видов атипичных микобактерий, в дозе 1 мг,

регламентированной нормативной документацией [136] выявило недостаточную интенсивность кожной реакции ГЗТ. При этом увеличение сенсibilизирующей дозы микобактерий *M. avium* и *M. intracellulerae* и *M. scrofulaceum* до 5 мг сопровождалось повышением сенсibilизирующей способности. Это в свою очередь связано с увеличением количества родоных антигенов, поступающих в организм морских свинок [35].

Также полученные результаты исследований предполагают увеличение как разовых, так и курсовых доз в два раза (5 мг, и 10 мг. двукратно с интервалом 14 дней).

В связи с тем, что эффективность внутрикожного способа введения атипичных микобактерий в сравнении с внутримышечным, является сниженным [136, 221] указанный вариант в исследованиях не использовался.

Таким образом, проведенные диссертационные исследования демонстрируют не равнозначность способов сенсibilизации морских свинок.

Анализ проведенных исследований продемонстрировал, что в сравнении с сенсibilизацией морских свинок живыми микобактериями использование инактивированных характеризуется высокой чувствительностью, но низкой специфичностью. Поэтому последующие исследования иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов осуществлены только при использовании живых микобактерий.

Различия, полученные при использовании одинаковых доз, но разных путей введения микобактерий в организм морских свинок, предполагает различие в механизме формирования кожной реакции ГЗТ. Так исследованиями разных авторов продемонстрировано, что подкожное введение микобактерий в сравнении с внутрикожным характеризуется более быстрым захватом макрофагами и клональной селекцией большего числа супрессорных Т-клеток и соответственно пониженной интенсивностью ГЗТ, и в свою очередь получить соответствующую зависимость: доза- интенсивность кожной реакции ГЗТ и в свою очередь получать воспроизводимые и сходимые результаты исследований [216].



При оценке биологического эквивалента, тестируемого микобактериального аллергена, относительно контроля междозовый интервал может быть равен: 2; 2,5; 5 или 10. Причем междозовый интервал 2-5 целесообразен при использовании более 2 дозировок тестируемого и контрольного препаратов. Вместе с тем интервал равный 10 предполагает использование не более двух дозировок, как испытуемого, так и контрольного препаратов [92, 93].

В различных нормативных документах, регламентирующих контроль качества микобактериальных аллергенов диапазон доз, который целесообразно использовать, не представлен. В свою очередь использование неэквивалентных доз является значимой причиной погрешности биологических тестов, на что указывают результаты теоретических расчетов собственных исследований.

Так, например, в серии предварительных исследований было определено, что одновременное использование нескольких доз микобактериальных аллергенов сопровождается уменьшением интенсивности реакции каждого из разведения, в сравнении с использованием аналогичных единичных дозировок в группах крупного рогатого скота, инфицированного патогенными микобактериями туберкулёза [120]. Аналогичная зависимость была определена в группах животных, иммунизированных микобактериями различных видов. Выявленная закономерность предполагает необходимость подбора диапазона доз приемлемого для оценки иммунобиологических критериев микобактериальных аллергенов. При этом оценка биологических характеристик туберкулиновых аллергенов должна проводиться с использованием линейного диапазона доз, характеризующихся зависимостью: доза (МЕ)- интенсивность кожной реакции ГЗТ, обозначаемая коэффициентом «*v*» [216].

При контроле микобактериальных аллергенов нормативной документацией предусмотрено использование патогенных микобактерий туберкулёза [62, 274, 275].

Исследованиями продемонстрировано, что введение туберкулина морским свинкам, инфицированным патогенными микобактериями туберкулёза, сопровождается развитием как нормергической, так и гиперергической реакцией,

а в некоторых случаях сопровождается гибелью животных, что в свою очередь определяется дозировкой микобактериального аллергена [127].

Используемые дозировки микобактерий различных видов должны обеспечивать оптимальную иммуногенность, сохраняющуюся длительный период времени.

Таким образом, необходимо учитывать два условия:

1) Чувствительность и специфичность вариантов сенсibilизации морских свинок являются взаимозависимыми: чем больше чувствительность, тем меньше специфичность;

2) Вариант сенсibilизации морских свинок должен обеспечивать чувствительность при использовании нескольких дозировок на уровне единицы биологической активности и более.

В свою очередь определить эквивалентный диапазон дозировок микобактериальных аллергенов возможно двумя методическими подходами:

1) Использованием нескольких дозировок как исследуемого, так и контрольного препаратов с расчетом параметра активности и последующим сравнением результатов полученные в нескольких группах (указанный вариант является более трудоёмким).

2) Использованием не равнозначного диапазона доз в нескольких группах морских свинок, с расчетом интенсивности и процента реагирующих.

Первый вариант предполагает большое число повторных исследований, в то время как второй небольшое число исследований.

Так использование повышенных и пониженных дозировок, в двух группах морских свинок, сенсibilизированных микобактериями, позволило оценить эффективность диапазона доз, поэтому второй вариант является предпочтительным. Сопоставление результатов исследований в экспериментальных группах продемонстрировало, что на одни и те же дозы реакции могут выпадать, что в свою очередь предполагает необходимость учета именно суммарного значения в МЕ.

В результате проведенных исследований было выявлено, что оптимальными, для оценки биологической активности в гомологичной сенсibilизации, с учетом тестируемого и контрольного препаратов являются дозы: 62 - 310 МЕ в отношении туберкулина для млекопитающих и туберкулина для птиц, а в отношении КАМ: 62 - 310 ЕД.

Полученные результаты диссертационного исследования демонстрируют универсальность предлагаемого подхода в оценке диапазона доз в отношении усовершенствования существующих и разработке перспективных аллергодиагностикомов.

Принимая во внимание значение биологической активности туберкулина для млекопитающих как одного из ключевых показателей, влияющий на диагностическую эффективность аллергической пробы используемый лабораторный тест должен обеспечивать сходимые и воспроизводимые результаты.

Известно, что биологическую активность ППД для млекопитающих можно оценить, как на сенсibilизированных микобактериями морских свинок, так и на инфицированном микобактериями крупном рогатом скоте [22, 320, 322] (аналогично как оценивается биологическая активность туберкулина *PPD-S* в медицинской практике) на инфицированных людях и сенсibilизированных морских свинок. Для сопоставления вариантов биологической модели были использованы два образца ППД туберкулина для млекопитающих с неодинаковым содержанием белка.

Исследованиями, проведенными на иммунизированных авирулентными микобактериями *M. bovis* морских свинок и крупном рогатом скоте, инфицированном микобактериями туберкулёза бычьего вида выявлено различие биологической активности аллергена для млекопитающих (образца препарата с минимальным содержанием белка) в 1,5 раза.

В тоже время образец туберкулина для млекопитающих, с максимальным содержанием белка характеризовался равнозначностью, как на морских свинок, сенсibilизированных *M. bovis*, так и крупном рогатом скоте, инфицированном *M.*

*bovis*. Подобную разницу можно объяснить большей чувствительностью морских свинок, в сравнении с крупным рогатым скотом.

Учитывая предпочтительность использования морских свинок для оценки иммунобиологических показателей туберкулинов были проведены исследования зависимостей: концентрация белка- биологическая активность в соответствии двух методических расчетов: ГОСТ 16739-88 и МЭБ [320-323]. Проведенные исследования продемонстрировали, что метод МЭБ позволяет более точно характеризовать зависимость концентрации белка и биологической активности в сравнении с методом, принятым в России (ГОСТ 16739-88), что в свою очередь также характеризует сенсibilизацию морских свинок как наиболее чувствительную модель.

Также исследованиями, проведенными ранее, была продемонстрирована более высокая вариабельность значений аллергической реакции у крупного рогатого скота, инфицированного микобактериями туберкулёза, в сравнении с сенсibilизированными морскими свинками [92]. Причинами большей вариабельности туберкулиновой реакции у инфицированного крупного рогатого скота могут быть обусловлены значительными различиями сроков инфицирования, стадией течения туберкулёзного процесса, а также физиологическими особенностями животных [136, 328, 339]. Напротив, для определения биологической активности очищенного туберкулина на морских свинках могут быть воспроизведены условия, обеспечивающие синхронность патогенетических процессов и равнозначность физиологических параметров [99].

Изучение биологических критериев туберкулиновых аллергенов на сенсibilизированных морских свинках, с учетом оценки используемых критериев, позволяет получать воспроизводимые и сходимые результаты аллергического тестирования животных в хозяйствах с различной эпизоотической обстановкой по микобактериальным инфекциям.

Так в производственных условиях, при естественной сенсibilизации крупного рогатого скота атипичными микобактериями, при учете симультанной пробы с туберкулином для млекопитающих и КАМ и определении достоверности

аллергической реакционности на тот или иной аллерген регистрируется перемежающийся характер аллергических реакций, что вызывает значительные сложности.

Таким образом, принимая во внимание данные литературы [136, 221] и результаты собственных исследований морская свинка является предпочтительной лабораторной моделью при реализации множества экспериментально-практических задач проблем туберкулёза.

Вместе с тем для оценки эффективности диагностических дозировок, а также их сравнения исследованиями продемонстрирована предпочтительность использования, инфицированного крупного рогатого скота [92, 95].

Учитывая вышеизложенное в нормативной документации РФ СТО 004829-0001-2004 (документа, используемого после ГОСТ 16739-88), ГОСТ 32306-2013 (используемой в настоящее время) применяются только сенсibilизированные морские свинки при тестировании по параметру биологическая активность туберкулина очищенного для млекопитающих.

Общепринято, что в Российской Федерации тестирование туберкулиновых аллергенов осуществляется на рандомбредных морских свинках группированных по экстерьерным признакам и сенсibilизированными соответствующими видами микобактерий [28, 29, 30]. Указанный подход выработан в течение нескольких десятилетий становления методологии оценки биологической активности с использованием морских свинок. Вместе с тем в странах дальнего зарубежья, при осуществлении лабораторного контроля микобактериальных аллергенов применяются инбредные морские свинки (например, линии *Hartley*). Так предполагается, что инбредные животные характеризуются предпочтительностью, в сравнении с раздобренными в связи с наиболее точными получаемыми результатами исследований.

В свою очередь использование морских свинок, полученных близкородственным скрещиванием имеют свои недостатки, так известно, что указанные животные являются гомозиготными, характеризующиеся высокой

частотой негативных мутаций, в сравнении с животными, полученными не близкородственным скрещиванием [239].

В то же время, используя критерии формирования морских свинок в группы, в соответствии их иммунологической реактивности, обеспечит приемлемую точность исследований.

Так проведенные исследования продемонстрировали положительную корреляцию между размером воспалительного инфильтрата (введение *M. bovis*), и значением воспалительной реакции в месте введения ППД для млекопитающих морских свинок.

Эффективность аллергической диагностики микобактериальных инфекций определяется качественными характеристиками туберкулинов [92, 93]. Вместе с тем имеются противоположные мнения относительно времени учета кожной туберкулиновой реакции на различные разведения туберкулинов.

Исследованиями продемонстрирована наибольшая выраженность у иммунизированных микобактериями разных видов морских свинок кожной туберкулиновой реакции после предшествующей инъекции разведений через 24 часа. При этом к 48 часам, после инъекции разведений туберкулинов интенсивность реакции снижается без значимого изменения вариации, но спустя 72 часа после инъекции туберкулинов вариабельность значений увеличивается, но при значительном снижении интенсивности реакции. Кроме того, в период 24-72 часа меняется соотношение воспалительных элементов кожной реакции ГЗТ от красного до бледно-розового цвета при значительном снижении инфильтрации.

Таким образом как продемонстрировали настоящие исследования использование обоснованного временного периода оценки кожной туберкулиновой реакции ГЗТ является значимым условием для получения воспроизводимых и сходимых результатов исследований иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов.

В соответствии литературных данных контроль качественных параметров микобактериальных аллергенов на сенсibilизированных морских свинках осуществляется однократно, или в период до 6 месяцев. Вместе с тем

себестоимость, сенсibilизированных соответствующим видом микобактерий морских свинок (и сформированной иммунологической реактивностью) значительно превышает себестоимость не иммунных животных, что обуславливает определение целесообразного периода использования животных. Обоснованием более длительного периода использования сенсibilизированных морских свинок основано на исследовании, продемонстрировавшем длительную сохранность кожной туберкулиновой реакции ГЗТ в медицинской практике при использовании вакцины БЦЖ [72, 73, 125], а также у крупного рогатого скота, искусственно сенсibilизированного микобактериями различных видов [221, 242].

В соответствии литературных данных, среди лабораторных методов диагностики туберкулёза биопроба позволяет выявить этиологический агент, даже если в образце присутствуют единичные микобактерии, в связи, с чем указанный метод является высокочувствительным [1, 215, 217, 223].

Проведенные нами исследования продемонстрировали, что в соответствии: «Наставления по диагностике туберкулёза животных» от 2002 года, используемая для оценки развития специфического туберкулёзного процесса у морских свинок доза туберкулина для млекопитающих 25 единиц выраженная относительно предшествующего стандарта активности соответствует 5 Международных единиц *PPD-bovine* используемого в настоящее время. При этом с учетом диапазона содержания Международных единиц в мл. объема при приготовлении стандартного разведения (в 200 раз) обуславливает содержание МЕ: 3,3-5-7,5 и позволяет в 100% выявлять состояние ГЗТ при сенсibilизации микобактериями бычьего вида.

Учитывая восприимчивость морских свинок к микобактериям, инфицированные морские свинки используются как модель исследования иммунных механизмов [219, 220, 226]. При этом фагоцитоз является одним из первых механизмов защиты от микобактериальных патогенов [132, 317]. Последующие исследования включали оценку содержания лейкоцитов в крови морских свинок, в различные периоды времени формирования состояния ГЗТ и

развития туберкулиновой реакции, а также оценку фагоцитоза латексных частиц в период формирования ГЗТ и развития аллергической реакции на аллерген для млекопитающих.

Проведенные нами исследования показали, что к периодам развития состояния ГЗТ, а также формирования туберкулиновой реакции на введение ППД для млекопитающих у сенсibilизированных микобактериями бычьего вида морских свинок количество сегментоядерных нейтрофилов возрастает, при снижении количества лимфоцитов. Также установлено, что максимальная интенсивность фагоцитоза регистрируется на 14 сутки, после сенсibilизации с последующим угнетением на 30 сутки, а также после постановки теста ГЗТ. В соответствии литературных данных [231] выявленные изменения содержания сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов у морских свинок характеризуют нейтрофильную фазу туберкулёзной инфекции.

Для получения воспроизводимых и сходимых результатов исследования иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов необходимо учитывать соответствующие погрешности [4, 70]. Погрешности, влияющие на результаты оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов можно классифицировать в две группы: 1. обусловленные биологической моделью; 2. опосредованные оператором;

Вместе с тем используя современные методические подходы, можно значительно снизить влияние указанных погрешностей опосредованные оператором, например, посредством использования технического устройства оценки биологических критериев туберкулиновых аллергенов.

При оценке у морских свинок воспалительной реакции на различные дозировки тестируемого и контрольного туберкулинов двумя операторами выявляются различия, при этом вариабельность расчетных значений активности, по нашим наблюдениям, колеблется в пределах 20%, что снижает



воспроизводимость и сходимость результатов тестирования биологических критериев.

Основные причины подобных различий обусловлены затруднениями в объективной оценке границ воспаления, в связи с неодинаковой выраженностью воспалительных элементов папула-эритема и натяжением кожи.

Одним из возможных вариантов нивелирования указанных погрешностей является использование специализированных устройств характеризующиеся следующими параметрами: 1. возможностью цифрового захвата изображения с необходимым разрешением; 2. наличия фиксирующего устройства, обеспечивающего стандартное натяжение кожи; 3. обеспечивающее равномерный световой поток. На основании указанных параметров было разработано специализированное техническое устройство.

Исследования продемонстрировали, что использование устройства позволит фиксировать кожный покров морских свинок и формировать цифровые изображения, с возможностью осуществления детализации границ аллергической реакции, исключая влияние неодинаковой освещенности в помещении, а также индивидуальными параметрами зрения.

В настоящее время при осуществлении статистических расчетов в различных научных направлениях используется специализированное программное обеспечение, позволяющее интенсифицировать и снизить погрешность рутинных исследований [295]. Специализированного программного обеспечения для осуществления расчетов биологических параметров микобактериальных аллергенов не имеется. Учитывая указанное, нами разработано специализированное программное обеспечение.

Применение разработанного программного обеспечения позволило стандартизировать и интенсифицировать этап статистического расчета иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов (активности и специфичности). Также софт может быть использован при

разработке новых и усовершенствования существующих методик иммунобиологического контроля микобактериальных аллергенов. Для примера, исследованиями было установлено, что реактогенность микобактериальных аллергенов обусловлена содержанием пирогенов, использование разработанного программного обеспечения позволило не только определить пороговые значения пирогенов на различных этапах изготовления микобактериальных аллергенов, но и оценить их количественно.

В настоящее время для туберкулинов, изготовленных из микобактерий: *M. tuberculosis*, *M. bovis* и *M. avium* разработаны Международные стандарты активности [247, 248, 249]. Вместе с тем, в отношении аллергенов из атипичных микобактерий соответствующих Международных стандартных препаратов не разработано. При этом применение в качестве стандарта - Международного стандарта туберкулина для птиц по отношению к комплексному аллергену из атипичных микобактерий, как было выявлено, наиболее в антигенном строении сходен с одним из компонентов. При этом оба компонента КАМ определяют равнозначную половину биологической активности [59, 227, 228], поэтому использование в качестве эталона ППД для птиц нецелесообразно.

Последующие эксперименты продемонстрировали, что активность КАМ следует оценивать на морских свинках, сенсibilизированных смесью атипичных микобактерий *M. intracellulatae* и *M. scrofulaceum*, то есть полностью гомологичной сенсibilизации, что соответствует требованиям международной практики [61, 216, 322].

Также при осуществлении контроля в качестве контроля следует использовать аллергены, составленные из микобактерий *M. intracellulatae* и *M. scrofulaceum*. Биологическую активность контрольного препарата целесообразно оценивать в соответствии варианта, предполагающего определение минимального количества белка необходимое для выявления состояния ГЗТ. Суммарная активность комплексного аллергена,

составленного из моноаллергенов, должна соответствовать 6750 ЕД/см<sup>3</sup> раствора.

Выбор критериев оценки аллергической реактивности у морских свинок обусловлен тем, что 5 мм. считается реакцией в соответствии «Наставления по диагностике туберкулёза животных» от 2002 года. Вместе с тем с учетом погрешности реакцией следует считать значение от 7 мм. При составлении новой эталонной серии КАМ и оценке биологической активности моноаллергенов было определено, что 2,6 мг моноаллергена *M. intracellulareae* соответствуют необходимому значению 3375 ЕД, в то время как 0,9 мг. моноаллергена *M. scrofulaceum* соответствуют 3375 ЕД. Таким образом при формировании смеси моноаллергенов суммарное значение белка составит 3,5 мг. Вместе с тем при приготовлении рабочего разведения контрольного комплексного аллергена соотношение 100 ЕД в сравнении с 100 МЕ ППД для млекопитающих будет характеризоваться соотношением 5 к 1. Кроме того при проведении сравнительных исследований на крупном рогатом скоте, сенсibilизированном атипичными микобактериями используемая дозировка в 3,5 раза будет превышать рекомендованную по белку.

В то же время в исследованиях Козлова В.Е. [59] продемонстрирована, что дозировка КАМ должна соответствовать не 1350 ЕД/ 0,2 см<sup>3</sup>, а 800 ЕД/ 0,2 см<sup>3</sup>, соответственно в 1 см<sup>3</sup> раствора должно содержаться 200 ЕД. Приведенные данные позволяют уменьшить дозировки контрольного КАМ в соответствии расчета 6750 ЕД: 2000 ЕД = 3,375, что в пересчете по белку составит 3,5 мг: 3,375= 1,04. Таким образом, указанный подход может быть использован при формировании контрольной серии КАМ в соответствии Международных требований.

В соответствии требований Международной практики одним из ключевых параметров микобактериальных аллергенов является специфичность [61, 62, 216], которая оценивается на лабораторных животных (морских свинках) иммунизированных микобактериями характеризующиеся минимальной гомологией с тестируемым туберкулином.

Например, в отношении ППД для млекопитающих гетерологичной является сенсibilизация морских свинок микобактериями птичьего вида, а в отношении ППД для птиц гетерологичной являются сенсibilизация морских свинок микобактериями бычьего вида. При этом в качестве контроля используется микобактериальный аллерген гомологичный варианту сенсibilизации.

Предварительно проведенные исследования продемонстрировали, что оценку специфичности комплексного аллергена необходимо проводить параллельно с туберкулином для млекопитающих в группе животных иммунизированных атипичными микобактериями и группе животных иммунизированных туберкулёзными микобактериями бычьего вида. Анализ литературных и собственных исследований продемонстрировали, что при разработке методики оценки специфичности микобактериального аллергена должны быть учтены следующие условия:

1. Соответствие максимальных и минимальных дозировок гетерологичных аллергенов обеспечивающие близкие значения кожной туберкулиновой реакции ГЗТ;

2. Соответствие кожной реакции ГЗТ на гетерологичный туберкулин диапазону 8-25 мм.

На стабильность иммунобиологических свойств туберкулиновых аллергенов оказывает влияние множество факторов, которые определяются технологической схемой изготовления, а также условиями хранения [7, 59, 87].

В соответствии действующих нормативов стабильность иммунобиологических препаратов может быть установлена путем хранения в условиях отсутствия света и определенной температуре (наиболее часто используется диапазон от 2 до 8°C), либо методом ускоренного хранения [33]. Так известно, что при повышении температуры хранения лекарственного средства закономерно возрастает скорость физико-химических реакций и ускоряются деградационные процессы [274, 275].

Исследование трех препаратов хранившихся при температуре 2-8 °С продемонстрировали не равнозначный результат стабильности биологических параметров. Выявлено, что АТК характеризуется стабильностью. При этом вероятнее всего сохранность биологических свойств АТК, в сравнении с другими исследованными туберкулинами, связаны с продуктами водно-термического гидролиза стабилизирующие биологически активные белки [7, 59, 66]. В то же время, принимая во внимание данные литературы, характеризующие АТК как смесь не только микобактериальных соединений, но и соединения не микобактериальной природы, такие как не стандартизируемые соединения культуральной среды, повышенная реактогенность является вполне ожидаемой [66, 114, 116].

Вместе с тем выявлено, что НСМ туберкулин и безальбумозный туберкулин менее стабильны, даже с учетом их меньшего периода хранения, в сравнении с АТК.

В РФ разработаны и широко используются три микобактериальных туберкулина: туберкулин для млекопитающих, туберкулин для птиц и комплексный аллерген из атипичных микобактерий.

Известно, что ППД для млекопитающих содержит незначительное количество родových антигенов микобактерий, поэтому при исследовании животных на микобактериальные инфекции может регистрироваться перекрестная аллергическая реакция, обусловленная сенсibilизацией нетуберкулёзными микобактериями [334, 335, 336, 337], дифференцировку, которой возможно осуществить, используя симультанную аллергическую пробу с ППД для птиц или КАМ [149, 363, 378].

Вместе с тем, не смотря на определенную схожесть состава ППД для птиц и КАМ, аллергены не являются равнозначными препаратами в связи с тем, что процентный состав видовых и групповых антигенов различен [127, 324, 343]. Так известно, что антигенный состав комплексного аллергена более широкий, в сравнении с ППД для птиц [115, 224, 225]. КАМ представляет собой комплексный иммунобиологический препарат, в состав которого входят белковые соединения

атипичных микобактерий *M. intracellulareae* и *M. scrofulaceum*. В тоже время регистрируются постоянные изменения в экологии микобактерий в связи, с чем актуальными являются исследования по совершенствованию существующих и разработке новых микобактериальных аллергенов для дифференциально - даигностических исследований.

Последующие исследования были направлены на усовершенствование комплексного аллергена на основе атипичных микобактерий. В результате проведенных исследований были изготовлены опытные лабораторные серии новых комплексных аллергенов (КАМ-2 и КАМ-3), которые были тестированы в сравнении с бивалентным аллергеном КАМ.

Сравнительный анализ комплексных аллергенов из атипичных микобактерий, изготовленные в ВИЭВ в сравнении с коммерческим комплексным аллергеном и туберкулином для птиц убедительно продемонстрировал предпочтительность по критериям специфичности и активности комплексного аллергена КАМ-3.

Актуальными являются разработка аллергенов для выявления сенсibilизации животных НТМБ и микобактериями паратуберкулёза. В лаборатории хронических исследований ВИЭВ были проведены исследования по разработке аллергена для аллергической диагностики паратуберкулёзной инфекции у крупного рогатого скота.

В настоящее время для осуществления аллергического тестирования животных на паратуберкулёз используются ППД для птиц (в настоящее время) или Ионин (использованный ранее). При этом ППД для птиц изготовлен с использованием микобактерий *M. avium subsp. avium*, в то время как Ионин изготовлен с применением микобактерий *M. avium subsp. paratuberculosis*. В свою очередь исследования методом ДНК-ДНК-гибридизации продемонстрировали генетическую гомологию *M. paratuberculosis* и *M. avium* [127]. В тоже время описанные аллергены не являлись абсолютно гомологичными, что позволяет предположить усиление диагностических свойств аллергена, в состав которого будет представлен аллергенами *M. avium subsp.*

*avium* и *M.avium subsp. paratuberculosis*. Изучение в лабораторных условиях иммунобиологических показателей комплексного аллергена «Параавиум» продемонстрировала возможность оценки его аналогично как ППД для птиц, в соответствии Международных требований. Препарат «Параавиум» при тестировании на сенсibilизированных разными микобактериями лабораторных животных продемонстрировал лучшие диагностические свойства, позволяющие проведение дальнейших исследований в производственных условиях.

Весомой задачей в разработке противопаратуберкулёзных мероприятий является создание биологической модели паратуберкулёза. Многочисленные исследования в этом направлении не увенчались успехом. Нами проведены исследования по разработке биологической модели паратуберкулёзной инфекции. Исследованиями по оценке иммунизирующих свойств микобактерий паратуберкулёза на морских свинках показали, что использование культур *M. avium subsp. paratuberculosis* в дозе 5 мг. подкожно не сопровождается развитием аллергической реакции, вместе с тем при подкожном введении микобактерий паратуберкулёза в указанной дозировке (в составе адьюванта) вызывает сенсibilизацию организма морских свинок и демонстрирует развитие реакции ГЗТ. Последующее наблюдение за животными двух групп продемонстрировало, что введение микобактериальной суспензии с адьювантом сопровождается развитием воспалительной реакции по типу абсцесса. В то время как при подкожном введении микобактерий паратуберкулёза в 4 места в области спины морских свинок подобное воспаление не выявляется. Таким образом, получена биологическая модель для оценки микобактерий паратуберкулёза *in vivo*. Кроме того, при использовании микобактериальных аллергенов равнозначной биологической активности для оценки сенсibilизирующих свойств микобактерий паратуберкулёза продемонстрировало более выраженную реакцию на комплексный аллерген «Параавиум» (5 ЕД.) в сравнении с ППД для птиц (5 МЕ.) при аллергической диагностике паратуберкулеза крупного рогатого скота и лабораторной диагностике паратуберкулёзной инфекции.

## 6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа направлена на совершенствование системы диагностики микобактериальных инфекций животных, а именно на изучение условий и факторов оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов, а также разработку и усовершенствование аллергодиагностикомов. В результате проведенных исследований были выявлены значимые критерии, влияющие на результаты исследований, такие как вариант сенсибилизации морских свинок, эквивалентные дозы микобактериальных аллергенов.

Проведены сравнительные исследования по совершенствованию биологической модели микобактериальных инфекций животных. Так исследованиями определена предпочтительная животная модель. Предложен принцип группирования животных в соответствии иммунологической реактивности. Определены оптимальные временные интервалы оценки иммунологической реактивности сенсибилизированных морских свинок. Рассчитана оптимальная диагностическая доза и её интервал для оценки туберкулёзной инфекции у морских свинок.

Проведенные исследования по совершенствованию тестов оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов позволили разработать инструментальный способ оценки кожной реакции ГЗТ, специализированное программное расчёта иммунобиологических параметров туберкулинов. Предложены подходы оценки активности и специфичности комплексных аллергенов из атипичных микобактерий.

Разработаны и исследованы комплексные аллергены на основе микобактерий различных видов, продемонстрировавшие высокие диагностические характеристики.

Разработана модель развития ГЗТ на микобактерии паратуберкулёза у морских свинок.



## 7. ВЫВОДЫ

1. Усовершенствована аллергическая диагностика туберкулёза и паратуберкулёза крупного рогатого скота, на основе разработанных туберкулиновых аллергенов.

2. Определено, что при оценке иммунобиологических критериев туберкулиновых аллергенов оптимальным вариантом является внутрикожная сенсibilизация морских свинок *M. bovis* БЦЖ, в дозе 0,2 мг. Оптимальным вариантом сенсibilизации морских свинок *M. avium* и разными видами атипичных микобактерий является подкожное введение микобактерий, в дозе 5 – 10 мг.

3. Показано, что для оценки биологических параметров туберкулина для млекопитающих и туберкулина для птиц эквивалентными дозами являются 62 МЕ-310 МЕ, а для КАМ 62 ЕД-310 ЕД.

4. Установлено, что максимальная интенсивность кожной реакции ГЗТ у морских свинок иммунизированных разными видами микобактерий выявляется через 24 часа, после внутрикожного введения микобактериальных аллергенов, поэтому учет аллергической реакцией следует проводить один раз в этот период времени. Иммунологическая реактивность организма сенсibilизированных разными видами микобактерий морских свинок остается стабильной в течение 14 месяцев, после сенсibilизации.

5. Выявлено, что сенсibilизированные микобактериями морские свинки является более чувствительной моделью, в сравнении с инфицированным крупным рогатым скотом, для оценки биологических параметров туберкулиновых аллергенов. Методика расчета биологических параметров микобактериальных аллергенов МЭБ характеризуется предпочтительностью, в сравнении с методом принятым в России (ГОСТ 16739-88).

6. При проведении биопробы на лабораторных животных, ранее используемая доза туберкулина для млекопитающих 25 ТЕ PPD-S, соответствует 5 МЕ PPD-bovine, используемых в настоящее время. Использование стандартного

разведения промышленных серий туберкулина для млекопитающих с биологической активностью 6600 – 15000 МЕ в 100% случаев позволяет выявлять состояние ГЗТ у лабораторных животных.

7. Показано, что у морских свинок, сенсibilизированных микобактериями бычьего вида, к периоду развития туберкулиновой аллергии, возрастает количество сегментоядерных нейтрофилов, но снижается количество лимфоцитов. Максимальная интенсивность фагоцитоза, после сенсibilизации морских свинок микобактериями бычьего вида, регистрируется на 14 сутки и с последующим снижением как на 30 сутки, так и после постановки теста ГЗТ с ППД-туберкулином для млекопитающих.

8. Разработано и апробировано техническое устройство для измерения внутрикожной реакции у морских свинок, позволяющее точно определять границы воспалительного процесса, в месте введения аллергенов. Разработано и апробировано специализированное программное обеспечение, позволяющее оперативно и точно провести статистическую обработку количественных значений кожной реакции ГЗТ и оценку активности и специфичности микобактериальных аллергенов.

9. Разработаны эталонные образцы микобактериальных моно аллергенов, для оценки биологической активности КАМ, в соответствии с требованиями МЭБ. С учетом современных требований разработана методика оценки специфичности КАМ на лабораторных животных.

10. Установлено, что при длительном хранении, альттуберкулин для млекопитающих, в сравнении с туберкулином концентрированным нагреванием и безальбумозным туберкулином, характеризуется стабильностью биологических свойств.

11. Наибольшими сенсibilизирующими свойствами характеризуются нетуберкулёзные микобактерии: *M. intracellulareae*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum* и *M. smegmatis*, относящиеся ко 2, 3 и 4 группам по классификации Раньена, которые необходимо использовать при изготовлении комплексного аллергена, для проведения симультанной пробы.

12. Определено, что комплексный туберкулин из атипичных микобактерий, включающий аллергены: *M. avium*, *M. scrofulaceum* и *M. fortuitum* (классифицируемый как КАМ-3) в сравнении с промышленно производимыми аллергенами, и лабораторными образцами характеризуется наилучшими показателями активности и специфичности. Комплексный аллерген, в форме раствора для инъекций, характеризуется стабильностью.

13. Разработана технология изготовления комплексного аллергена, составленного из туберкулопротеинов *M. avium* и *M. avium subsp. paratuberculosis* для аллергической диагностики паратуберкулёзной инфекции животных. Комплексный аллерген Параавиум, в форме раствора для инъекций, характеризуется стабильностью.

14. Разработана биологическая модель воспроизведения ГЗТ на морских свинках, позволяющая методом усиления и пролонгации сенсibilизации, по интенсивности проявления аллергических реакций ГЗТ на разные микобактериальные антигены дифференцировать *M. avium subsp. paratuberculosis* от других видов микобактерий.

15. Установлено, что усиление сенсibilизирующих свойств *M. avium subsp. paratuberculosis* и других видов непатогенных для морских свинок НТМБ осуществляется подкожным введением микобактерий в 4 места спины, в дозе 5 мг, в составе адъюванта (ланолин, минеральное масло в соотношении 15:85 в 0,5 мл). Использование адъюванта позволяет пролонгировать сенсibilизацию животных и усилить иммунный ответ, на подкожное введение культур микобактерий.

16. В результате проведенных исследований решена в настоящее время актуальная задача, совершенствования диагностики туберкулёза и паратуберкулёза крупного рогатого скота имеющая важное значение в обеспечении ветеринарного благополучия животноводческих хозяйств Российской Федерации.

## 8. ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты диссертационных исследований отражены в следующих методических изданиях:

Профилактические, диагностические, ограничительные и иные мероприятия, установление и отмена карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов туберкулёза животных. Материалы рассмотрены и одобрены на заседании Научно-методической комиссии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол № 1 от 29 января 2019 г., протокол № 2 от 31 января 2019 г.). Рассмотрены и утверждены к печати на заседании Ученого совета ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол № 2 от 31 января 2019 г.), утверждены руководителем секции «Зоотехния и ветеринария» Отделения сельскохозяйственных наук РАН, академиком РАН Калашниковым В.В. 28 февраля 2019 г. Рекомендовано к изданию научно-техническим советом Минсельхоза России (протокол № 20 от 1 ноября 2019 г.).

Профилактические, диагностические, лечебные, ограничительные и иные мероприятия, установление и отмена карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию паратуберкулёза животных. Материалы рассмотрены и одобрены на заседании научно-методической комиссии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол № 1 от 29 января 2019 г.), рассмотрены и утверждены к печати на заседании Ученого совета ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол № 2 от 31 января 2019 г.), утверждены руководителем секции «Зоотехния и ветеринария» Отделения сельскохозяйственных наук РАН, академиком РАН Калашниковым В.В. 28 февраля 2019 г. Рекомендованы к изданию научно-техническим советом Минсельхоза России (протокол № 20 от 1 ноября 2019 г.).

Применение симультанной пробы с ППД туберкулином для млекопитающих и комплексным аллергеном из атипичных микобактерий (КАМ)

для индивидуального учета аллергических реакций, отбора реагирующих животных для диагностического убоя и установления диагноза на туберкулёз. Материалы рассмотрены и одобрены на заседании научно-методической комиссии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол № 3 от 16.06.2020 г.), рассмотрены и утверждены к печати на заседании Ученого совета ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол № 3 от 18.06.2020 г.), утверждены руководителем секции «Зоотехния и ветеринария» Отделения сельскохозяйственных наук РАН, академиком РАН Калашниковым В.В. 10.11.2020 г.

Туберкулины очищенные (ППД) для животных. Межгосударственный стандарт. ГОСТ 32306-2013. Москва Стандартиформ 2013. 32с.

## 9. РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Ветеринарным и биотехнологическим специалистам, занятым в изготовлении и контроле биопрепаратов, а также специалистам, осуществляющим аллергическую диагностику микобактериальных инфекций животных в лабораторных условиях:

При изучении биологических параметров туберкулиновых аллергенов использовать морских свинок, сенсibilизированных эквивалентными дозами микобактерий.

При оценке биологической активности аллергенов использовать 62-310 МЕ туберкулина для млекопитающих и туберкулина для птиц, а КАМ 62-310 ЕД.

При формировании групп морских свинок для определения биологических параметров туберкулиновых аллергенов формировать в соответствии кожной воспалительной реакции.

Учет кожной туберкулиновой реакции у сенсibilизированных морских свинок осуществлять через 24 часа после инъекции.

При учете кожной туберкулиновой реакции ГЗТ для оценки иммунобиологических параметров туберкулинов использовать специализированное техническое приспособление.

При изучении биологических параметров микобактериальных аллергенов использовать разработанное специализированное программное обеспечение.

Оценку специфичности комплексного аллергена осуществлять параллельно с ППД для млекопитающих в двух группах морских свинок: иммунизированных микобактериями бычьего вида и морских свинках, сенсibilизированных смесью атипичных микобактерий.

При разработке контрольных серий аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий суммарная эквивалентная активность моноаллергенов должна соответствовать 800 ЕД/см<sup>3</sup>.

Контроль активности и специфичности нового комплексного аллергена «Параавиум» для диагностики паратуберкулеза проводить, как и при оценке иммунобиологических свойств ППД для птиц.

В целях совершенствования и повышения эффективности лабораторной диагностики паратуберкулеза, следует использовать способ повышения иммунизирующих свойств микобактерий (разных видов) морских свинок, по интенсивности проявления аллергических реакций ГЗТ на разные аллергены позволяющей проводить дифференциацию *M. avium subsp. paratuberculosis* от других видов непатогенных для морских свинок НТМБ.

Комплексный аллерген Параавиум изготовленный из туберкулопротеинов рекомендуем использовать в целях совершенствования аллергической диагностики паратуберкулеза животных.

## 10. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АТК - альттуберкулин Коха
- ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения
- ГЗТ - гиперчувствительность замедленного типа
- ГИЭВ - государственный институт экспериментальной ветеринарии
- ГОСТ - Государственный стандарт
- ЕД - единица действия КАМ
- ИФА - иммуноферментный анализ
- КАМ - комплексный аллерген из атипичных микобактерий
- кДа - килодальтон
- КЖ - культуральная жидкость
- МЕ - Международная единица, установленная по международному стандарту
- мл.- миллилитры
- мм.-миллиметры
- МИФ - Макрофаг-ингибирующий фактор
- МХФ - макрофагальный хемотаксический фактор
- МЭБ - Международное эпизоотическое бюро
- НТБМ- нетуберкулёзные микобактерии
- ППД для млекопитающих – туберкулин очищенный (ППД) для млекопитающих
- ППД для птиц – туберкулин очищенный (ППД) для птиц
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- РФ- Российская Федерация
- СТО - Стандарт организации
- ТЕ - туберкулиновая единица, соответствующая требованиям, предусмотренным ГОСТ 16739-88
- ТУ - технические условия



ТХУ - трихлоруксусная кислота

CD - Cluster definition (антигены кластеров дифференцировки клеток)

HCSMT - Heat Concentrated Synthetic Medium Tuberculin

IL -Interleukin (интерлейкин)

IFN - Interferon (интерферон)

MAP -Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis

MHC – major histocompatibility complex (главный комплекс генов или белков гистосовместимости)

NIBSC – National Institute for Biological Standards and Control  
(Национальный институт биологических стандартов и контроля, Вейбридж)

PPD - Purified Protein Derivative (очищенное белковое производное)

TAF – Tuberculin albumofree (туберкулин, свободный от альбумоз)

Th1, 2 - T-helper (1, 2 - субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов -хелперов)

TNF - Tumor necrosis factor (фактор некроза опухоли)

WC1<sup>+</sup> - workshop cluster (рабочий кластер)

## 11. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авторское свидетельство № 173381 СССР МПК А 61К. Способ изготовления туберкулина; №905487/30-15: заявлено 11. 06. 1964; опубликовано 21. 07. 1965/ Архипов В.В. [и др.] заявитель и патентообладатель Архипов В.В. [и др.]-1с. :ил.
2. Аллахвердиев, И.И. Природные резервуары туберкулеза/ И.И. Аллахвердиев// Вестник ветеринарии.- 1997.- № 5.- С. 60-62.
3. Ауштрова, К.Н. Оптимизация системы подготовки производственных штаммов возбудителя туберкулеза при изготовлении очищенного туберкулина для млекопитающих: специальность 16.00.03 « Ветеринарная эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»:/ автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук/ Аушрова Карина Надаровна; Всесоюзный ордена трудового красного знамени государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов.- Москва, 1991.-21 с.- Место защиты: Всесоюзный ордена рудового красного знамени государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов.- Библиогр.: с. 21.
4. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях/ И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев.- Ленинград: Медгиз, 1962. 180 с.
5. Баратов, М.О. Особенности туберкулёза крупного рогатого скота в республике Дагестан (эпизоотология, диагностика, дифференциальная диагностика и меры борьбы): специальность 06.02.02 « Ветеринарная эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»:/ автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук/ Баратов, Магомед Омарович; Ставропольский государственный аграрный университет.- Ставрополь, 2017.- 46 с.- Место защиты: Ставропольский государственный аграрный университет.- Библиогр.: с. 45–46.
6. Безгин, В. М. Совершенствование промышленной технологии (ППД) туберкулина и его биохимическая характеристика: специальность 03.00.04

«Биохимия»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Безгин Вячеслав Михайлович; ВНИИ ветеринарии им. Я. Р. Коваленко.- Москва, 1990.- 27 с.- Место защиты: ВНИИ ветеринарии им. Я. Р. Коваленко. – Библиогр.: с. 26–27.

7. Безгин, В.М. Промышленная технология производства биологических препаратов для диагностики туберкулеза и лейкоза крупного рогатого скота: специальность 03.00.04 «Биохимия» и 03.00.23 «Биотехнология»: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук в виде научного доклада/ Безгин Вячеслав Михайлович; ВНИИ ветеринарии им. Я. Р. Коваленко.- Москва, 1999.- 51 с.- Место защиты: ВНИИ ветеринарии им. Я. Р. Коваленко. – Библиогр.: с. 49–50.

8. Безгин В.М., Козлов В.Е. Новые технологии производства диагностических препаратов для ветеринарной медицины/ В.М. Безгин, В.Е. Козлов // Міжвідомчий тематичний науковий збірник. Ветеринарна медицина. Вып. 81. Харків: 2003.- С. 205-208.

9. Биосинтез протеина микобактерий туберкулеза птиц в зависимости от сроков инкубирования культуры / М.М. Иванов [и др.] // Труды ГНКИ вет. препаратов. – Москва: ГНКИ, 1974.- Т. 20.- С. 112-117.

10. Боганец, Н.С., Хайкин Б.Я., Панкратов А.Д. Видовой состав микобактерий в хозяйствах с различной эпизоотической ситуацией. Паразиты и вызываемые ими болезни в Сибири/ Н.С. Боганец, Б.Я. Хайкин, А.Д. Панкратов//Новосибирск, 1997.- С. 17-19.

11. Бусол, В.А. Применение разных доз туберкулина при исследовании крупного рогатого скота на туберкулез/ В.А. Бусол, А.Ф. Кочмарский, А.А. Ткаченко // Ветеринария.- 1991.- № 11.- С. 21-23.

12. Бушмелева, В.П. Новые экспериментальные модели для биологической пробы при диагностике туберкулёза сельскохозяйственных животных: специальность 06.02.02 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук /

Бушмелева Полина Владимировна; Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока.- Новосибирск, 2011-20 с. – Место защиты: Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока. – Библиогр.: с. 18–19.

13. Бердюгина, О.В. Популяция  $\gamma\delta$  Т-клеток периферической крови при туберкулезе легких/ О.В. Бердюгина, А.В. Ершова //Медицинская иммунология.-2017.-Т.19.-С.139-140.

14. Бердюгина, О. В. Разработка иммунологических критериев активности туберкулемы/ О. В. Бердюгина, А. В. Ершова //Медицинская иммунология.-2017.-Т.19.-С.140-141.

15. Вейсфейлер, Ю.К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичных микобактерий/ Ю.К. Вейсфейлер. Будапешт, 1975.- 335с.

16. Видовая принадлежность микобактерий, выделяемых от крупного рогатого скота и из объектов внешней среды/ Н.П. Овдиенко, В.И. Косенко, А.Х. Найманов [и др.] // Проблемы туберкулёза.- 1990.- № 2.- С. 46 – 48.

17. Влияние иммуотропных препаратов на иммуногенез при вакцинации/ Ездакова И.Ю., Федоров Ю.Н., Ханис А.Ю. [и др.]// «Ветеринарная биотехнология: настоящее и будущее»: Сборник научных трудов./ ВНИИТИБП.- Щелково.-:ВНИИТИБП, 2004.- С.47-52.- Библиогр.:с.51-52.

18. Воспроизведение паратуберкулеза у экспериментально инфицированных *M. avium subs. Paratuberculosis* (MAP) лабораторных животных/ А.И. Завгодоний, С.Д. Позмогова, М.А.Гирка [и др.] // Ветеринарная медицина. – 2014.- Вып. 99.- С. 20-24.

19. Ваверен, Ван. Бруцеллёз и туберкулёз сельскохозяйственных животных/ Ван, Ваверен // Материалы Международной конференции МЭБ (28 июня-2 июля 1965 г.).- Москва, 1967.- С. 200-204.

20. Василенко, К.Ф. Сравнительная оценка альттуберкулина и туберкулопротеина при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота / К.Ф. Василенко // Сборник научных работ. Омск: 1974. -Вып. XXI. -С. 77-81.

21. Васильченко, Г.А. Аллергическая диагностика туберкулеза крупного рогатого скота/ Г.А. Васильченко// Научно-техн. бюлл. Новосибирск. 1982. -Вып. 11.- С. 9-10.

22. Выбор эталонной серии туберкулина (ППД) для млекопитающих для контроля и стандартизации производственных серий препарата/ В.Е. Козлов, Н.К. Букова, В.М. Безгин, **Ю.М. Мясоедов** [и др.]//Ветеринарная патология. Современные проблемы диагностики и профилактики туберкулёза животных.- 2004.- №1-2 (9). С. 80-82.

23. Выделение микобактерий и чувствительность крупного рогатого скота к туберкулину / Овдиенко Н.П., Кадочкин А.М., Найманов А.Х. [и др.] // Ветеринария. – 1988. – № 9. – С.26-28.

24. Вязов, О.Е. Лабораторная иммунология/ О.Е. Вязов.- Москва: Медицина, 1967.- С.14.

25. Галкин, Н.И. Физико-химические и биологические свойства туберкулопротеинов, очищенных гелем - фильтрацией: специальность 03.00.04 «Биохимия»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук/ Галкин Николай Иванович; Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии ВАСХНИЛ. - Москва, 1978.-15 с.- Место защиты: Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии ВАСХНИЛ. – Библиогр.: с. 15.

26. Гельман, Х.И. О свойствах туберкулина, полученного из туберкулезных бацилл, выращенных на картофеле / Гельман Х.И. // Архив биол. наук. – 1892. – Т. 1. – С. 138.

27. ГОСТ 13910-72. Альттуберкулин для млекопитающих: официальное издание: утвержден Государственным комитетом стандартов Совета Министров СССР 25 июля 1972 (протокол №109): введен в действие Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 14 августа 1972 г. №1588/ разработан Государственным научно – контрольным институтом ветеринарных препаратов Министерства сельского хозяйства СССР.- Москва: Государственный комитет стандартов совета министров СССР, 1972. -7 с.

28. ГОСТ 13909-68. Препараты биологические. Туберкулин для птиц: официальное издание: утвержден Комитетом стандартов, мер и измерительных приборов при Совете Министров СССР от 9 августа 1968: введен в действие: 1969-07-01/ разработан Государственным научно – контрольным институтом ветеринарных препаратов Министерства сельского хозяйства СССР.- Москва: Комитет стандартов, мер и измерительных приборов при совете министров СССР.-1968.-6с.

29. ГОСТ 23881-79. Технические условия. Туберкулин сухой очищенный (ППД) для птиц: утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 11 ноября 1979 г. №4241/ разработан министерством сельского хозяйства СССР.- Москва: Государственный комитет СССР по стандартам, 1980.-14с.

30. ГОСТ 16739-81. Технические условия. Туберкулин сухой очищенный (ППД) для млекопитающих: утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 21 августа 1981г. № 4016 разработан министерством сельского хозяйства СССР.- Москва: Государственный комитет СССР по стандартам, 1981. -18 с.

31. ГОСТ 16739-88. Технические условия. Туберкулин сухой очищенный (ППД) для млекопитающих: официальное издание: утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 08.07.88./ Разработан и внесен Госагробропром СССР.- Москва: Государственный комитет СССР по стандартам, 1988. -22 с.

32. ГОСТ Р ИСО 9001-2001. Системы менеджмента качества. Требования: официальное издание: Принят и введен в действие Постановлением Госстандарта России от 15 августа 2001 года N 333-ст. Разработан Всероссийским научно-исследовательским институтом сертификации (ВНИИС). Внесен Управлением сертификации Госстандарта России.- Москва: ИПК Издательство стандартов, 2001. - 21 с.

33. ГОСТ Р 52249-2004. Правила производства и контроля качества лекарственных средств: официальное издание: Утвержден и введен в действие

Постановлением Госстандарта России от 10 марта 2004 г. N 160-ст. Внесен Техническим комитетом по стандартизации ТК 458 "Производство и контроль качества лекарственных средств". Подготовлен Ассоциацией инженеров по контролю микрозагрязнений (АСИНКОМ) по собственному аутентичному переводу, указанному в пункте 4.- Москва: ИПК Издательство стандартов, 2004. - 212 с.

34. ГОСТ 32306-2013. Межгосударственный стандарт. Туберкулины очищенные (ППД) для животных: разработан Федеральным государственным бюджетным учреждением "Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов" (ФГБУ "ВГНКИ") и Федеральным государственным унитарным предприятием "Курская биофабрика - фирма "БИОК" (ФГУП "Курская биофабрика")/ внесен Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации (ТК 454): принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 сентября 2013 г. N 59-П): Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 17 октября 2013 г. N 1169-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32306-2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2015 года.- Москва.: Стандартиформ, 2014.- 16 с.

35. Грузевский, А.А. Современные данные о роли фотохромогенных микобактерий в патологии человека (обзор литературы) / Грузевский А.А. // Пробл. туберкулеза. – 1999. – № 6. – С. 58-60.

36. Гусейнов, Г.К. Типовая структура микобактерий туберкулеза и ее связь с эпидемическим процессом и эпизоотией в Дагестане / Г.К. Гусейнов, А.М. Зомалемшико, М.А. Муталимов // Проблемы туберкулеза. – 2002. – № 5. –С. 14-16.

37. Гутман, В.Г. Опыты с кохином на туберкулёзном рогатом скоте/ В.Г. Гутман. / Архив ветеринарных наук. -1890.-т.2.кн.6.- с.86-90.

38. Джупина, С.И. Теория эпизоотического процесса/ С.И. Джупина.- Москва, 2014. 123с.

39. Донченко, А.С. Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота / А.С. Донченко, Н.П. Овдиенко, Н.А. Донченко.- Новосибирск: Министерство сельского хозяйства России, Российская академия сельскохозяйственных наук, институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, Сибирское отделение РАСХН, 2004.-308с.- ISBN 5-7007-0176-6.

40. Диагностические критерии оценки состояния иммунной системы быков-производителей/ И.Ю. Ездакова, М.А. Еремина, М.С. Ефремова, Е.В. Фёдорова // Ветеринария и кормление.-2014.-№2.-С.10-12.

41. Епифанов, А.В. Вопросы эпизоотологии, совершенствование диагностики и профилактики туберкулеза крупного рогатого скота в Курской области: специальность 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Епифанов Александр Васильевич; Курская КГСХА.- Курск, 2000.-21с. -Место защиты: Курская КГСХА. – Библиогр.: с. 20–21.

42. Ерошенко, Л.А. Оптимизация метода определения активности туберкулина: специальность 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Ерошенко Людмила Алексеевна; Всероссийский государственный институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов.- Москва, 1997.-21с. – Место защиты: Всероссийский государственный институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов. – Библиогр.: с. 21.

43. Естественный путь заражения морских свинок от больных туберкулезом коров в неблагополучном хозяйстве/ А.Х. Найманов, М.С. Калмыкова, Н.Г. Толстенко [и др.] // Ветеринария и кормление. – 2021. – №5.-С. 25-29.

44. Ездакова, И.Ю. Рецепторы иммунного узнавания у животных/ И.Ю. Ездакова. - Москва: Компания Спутник+, 2008.-88 с.-ISBN 978-5-364-01149-7.



45. Завгодоний, А.И. Паратуберкулез сельскохозяйственных животных/ А.И. Завгодоний, С.Д. Позмогова, В.А. Глововко // Ветеринарная медицина. – 2010.- Вып. 94.- С. 171-173.
46. Завгодоний, С.Д. Позмогова, М.А. Гирка [и др.] // Ветеринарная медицина. – 2014.- Вып. 99.- С. 20-24.
47. Значение ПЦР в диагностике паратуберкулёза крупного рогатого скота/ А.Х. Найманов, Е.П. Вангели, Н.Г. Толстенко, Ю.М. Мясоедов// Ветеринария.- 2022.-№7.-С.-23-28.
48. Иванов, М.М. Туберкулин и аллергическая диагностика туберкулеза / М.М. Иванов // Труды ГНКИ.- Москва, 1959. – Том. 8. – С. 3-10.
49. Иванов, М.М. Некоторые вопросы борьбы с туберкулезом крупного рогатого скота и специфичность туберкулиновых реакций / М.М. Иванов // Бруцеллез и туберкулез. Материалы международной конференции МЭБ. – Москва, 1967. – С. 204-214.
50. Иванов, М.М. К вопросу дифференциации специфических и парааллергических реакций на туберкулин / М.М. Иванов, А.Н. Шаров // Материалы научно-производственной конференции ГНКИ. – Москва: ГНКИ, 1970. – С. 44-46.
51. Инструкция по изготовлению и контролю туберкулина очищенного (ППД) для млекопитающих. Утверждено главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР. – Москва, 1985.
52. Инструкция по применению туберкулина очищенного (ППД) для птиц (сухого). Утверждена Заместителем Руководителя Россельхознадзора РФ Н.А. Власовым 09.09.2014.- Москва, 2014.
53. Инструкция по применению туберкулина очищенного (ППД) для млекопитающих. Утверждена Заместителем Руководителя Россельхознадзора РФ Н.А. Власовым 03.10.2016.- Москва, 2016.
54. Инструкция по ветеринарному применению аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий (КАМ). Утверждена Заместителем Руководителя Россельхознадзора Н.А. Власовым 21.05.2019.- Москва, 2019.

55. Как это было. К 110-летию Российской агробиологической промышленности и Курской биофабрики: факты, события, воспоминания / авторы составители: В.М. Безгин [и др.].- Курск: Издательство КГСХА, 2006. – 688 с.: ил.- ISBN 5-7369-0501-9

56. Кассич, Ю.А. Определение природы реакций на туберкулин у крупного рогатого скота благополучных по туберкулезу ферм / Ю.А. Кассич, В.А. Кочмарский, А.И. Завгородний // Материалы Всесоюзной научно-практической конференции. – Гродно – 1987. – С. 71-71.

57. Качество туберкулина из одного штамма / А.Н. Шаров, В.С. Тырина, В.А. Алехин, В.М. Безгин // Ветеринария. – 1984. – № 10. – С. 24-25.

58. Кокуричев, П.И. Симультанная проба для диагностики туберкулеза / П.И. Кокуричев // Ветеринария. – 1966. – № 4. – С. 28-30.

59. Козлов, В.Е. Аллергены для диагностики туберкулеза: совершенствование производства и стандартизация: специальность 03 00 23 «Биотехнология» и 16 00 03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук / Козлов Владимир Егорович; Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов.- Москва, 2007.-43с. – Место защиты: Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов. – Библиогр.: с. 41–42.

60. Козлов В.Е. Оценка эффективности различных доз и методов введения туберкулина при диагностике туберкулеза КРС/ В.Е. Козлов, Ю.М. Мясоедов, В.М. Безгин. // Ветеринария.- 2004.-№11.- С. 5-8.

61. Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов. / Серия техн. докл. 384. – ВОЗ, Женева. – 1969. – С. 25-51.

62. Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов. Тридцать шестой доклад / Серия техн. докл. 745. – ВОЗ, Женева. – 1988. – С. 29-54.

63. Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов. 36-й доклад. Серия технических докладов 745. ВОЗ. Женева 1988. - С. 29-47.
64. Королюк, А.М. Когда появится новая туберкулезная вакцина? / А.М. Королюк, Л.А. Зазимко, С.В. Петровский // Микробиология.- 2015.-№1.- С.86-94.
65. Краснов, В.А. Взаимосвязь эпидемиологии и эпизоотологии туберкулеза в Западной Сибири / В.А. Краснов, Г.С. Мурашкина // Проблемы туберкулеза. – 1998. – № 5. – С. 8-11.
66. Курская биофабрика. К 100-летию биологической промышленности России. / Под. Ред. И.А. Бакулова и Н.С. Шевырева. – Курск: ГУИПП «Курск», 1996. – 608 с.- ISBN 5-7277-0133-3
67. Кузин, А.Н. Оздоровление животноводческих хозяйств от туберкулеза / А.Н. Кузин.- Москва: Россельхозиздат, 1987. – 139 с.
68. Кузин, А.Н. Вопросы профилактики туберкулеза крупного рогатого скота в условиях северного региона нечерноземной зоны / А.Н. Кузин, Л.К. Семина // Тезисы докладов научно-практической конференции «Основные научные исследования по проблеме туберкулеза и бруцеллеза с/х животных». – Новосибирск, 1995. – С.20-21.
69. Лазовская, А.Л. Быстрорастущие микобактерии, вызывающие микобактериозы у людей / А.Л. Лазовская, Л.С. Финкельштейн // Пробл. туберкулеза. – 1989. – № 12. – С. 46-50.
70. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – Москва.: Высшая школа, 1990. – 352 с.-ISBN 5-06-000471-6
71. Латышев, А.С. О природе сомнительных и неспецифических реакций на туберкулин у крупного рогатого скота / А.С. Латышев // Научные труды. Новосибирской НИВС. -Новосибирск: НИВС, 1971. – № 4. – С. 171-181.
72. Леви, Д.Т. Современные препараты туберкулина – методы получения, контроля, стандартизации и применения: специальность 03.00.07 «Микробиология» автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Леви Диана Тимофеевна; Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.

Тарасевича.- Москва, 1987.-56 с. – Место защиты: Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича. – Библиогр.: с. 52–55.

73. Леви, Д.Т. Оптимизация метода туберкулинодиагностики при использовании препарата ППД-БЦЖ / Д.Т. Леви, Т.Б. Яблокова, Л.Н. Жукова // Пробл. туберкулеза. – 1987. - № 12. – С. 5-8.

74. Линникова, М.А. Выращивание туберкулезных бацилл и приготовление туберкулинов на синтетических средах / М.А. Линникова, Л.П. Соловьева // Проблемы туберкулеза. – 1940. – № 6. – С. 69-73.

75. Линникова, М.А. Выращивание туберкулезных бацилл и приготовление туберкулинов на синтетической среде с заменой аспарагина гликоколом с экстрактивными веществами / М.А. Линникова, М.В. Могилевский // ЖМЭИ. – 1940. – № 1. – С. 97-101.

76. Линникова, М.А. Фракционирование очищенного сухого туберкулина путем высаливания с характеристикой химических и биологических свойств его фракций / М.А. Линникова, Б.А. Лянда-Геллер, О.И. Кичагова // Вопр. прикладной химии. – М., 1960. – С. 243-261.

77. Лысенко, А.П. Иммунохимический анализ хроматографических фракций *M. bovis* и *M. tuberculosis* / А.П. Лысенко // Ветеринария. – 1987. – № 12. – С. 32-36.

78. Лысенко, А.П. Антигенный состав ППД- туберкулинов для млекопитающих / А.П. Лысенко // Ветеринария. – 1989. – № 5. – С. 30-32.

79. Лысенко, А.П. Распространение микобактерий в благополучных по туберкулезу хозяйствах / А.П. Лысенко, А.Э. Высоцкий, И.И. Румачик // Ветеринария. – 2003. – № 5. – С. 19-21.

80. Лянда – Геллер, Б.А. Получение высокоактивной фракции очищенного сухого туберкулина, её химическая и биологическая характеристика/ Б.А. Лянда – Геллер // Проблемы туберкулёза. – 1963. - №9.- С.67-72.

81. Лященко К.П. Выделение видоспецифичного антигена *Mycobacterium bovis* и его кожно-туберкулиновая активность/ К.П. Лященко, С.А. Бобровник, С.В. Комиссаренко// Проблемы туберкулеза №8. 1991. с.12-14.

82. Мартма, О.В. Парааллергические реакции на туберкулин и их дифференциация / О.В. Мартма, К.К. Тяхнас // Ветеринария. – 1978. – № 4. – С. 35-38.

83. Мартма, О.В. О дифференциации парааллергических туберкулиновых реакций при использовании КАМ / О.В. Мартма, Х. Йыгиссар// Сборник научных трудов, Эстонской НИИЖиВ.- Тарту, 1981.-.52.-С. 34-39.

84. Малахов, А.Г. Биохимический полиморфизм туберкулопротеинов, полученных различными способами / А.Г. Малахов, Г.И. Устинова // Важнейшие исследования по изучению заболеваний с.-х. животных. Сборник трудов МВА.- Москва: МВА, 1973. – С. 8-9.

85. Маянский, А.Н. Туберкулез (микробиологические и иммунопатогенетические аспекты) / А.Н. Маянский // Иммунология. – 2001. – № 2. – С. 53-63.

86. Микробиология, вирусология и иммунология/ Под ред. В.Н. Царёва.. М.: ГОЭОТАР- Медиа, 2009. - 581с.- ISBN 978-5-98811-090-3

87. Митинская, Л.А. Туберкулодиагностика / Л.А. Митинская // Пробл. туберкулеза. – 1998. – № 3. – С. 76-77.

88. Многопараметрический анализ иммунологических показателей, ассоциированных с тяжестью туберкулеза легких/ Никитина И.Ю., Пантелеев А.В., Ганусов В.В., Лядова И.В.// Медицинская иммунология. -2017. -Т.19.-С.142.

89. Модификация симультанной аллергической пробы для индивидуального учёта результатов дифференциальной диагностики (первое сообщение)/ В. Е. Козлов, В. М. Безгин, Ю. М. Мясоедов [и др.] //Ветеринария.- 2011.- №8.- С. 28-32.

90. Молекулярные механизмы супрессии иммунного ответа при туберкулезе легких. Уразова О.И., Есимова И.Е., Кононова Т.Е. [и др.] //Медицинская иммунология.-2017. -Т.19.-С.143-144.

91. Мулик, А.Б. Оптимизация медико-биологического эксперимента *in vivo*/ А.Б. Мулик-Волгоград: Изд-во ВИЭСПа, 2003.-212с.- ISBN: 5-89713-039-6

92. Мясоедов, Ю.М. Изучение биохимических и биологических свойств ППД туберкулина для млекопитающих и его стандартизация: специальность 03.00.04 «Биохимия» и «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Мясоедов Юрий Михайлович; Курская государственная сельскохозяйственная академия им. Иванова И.И.-Курск, 2006.- 24 с. – Место защиты: Курская государственная сельскохозяйственная академия им. Иванова И.И.- – Библиогр.: 23 с.

93. Мясоедов, Ю. М. Оптимизация теста определения биологической активности ППД туберкулина для млекопитающих/ Ю. М. Мясоедов, С.В. Морозов // Вестник КГСХА.- 2012.- №9.- С.71-74.

94. Мясоедов, Ю.М. Разработка лабораторной модели в целях выявления ПЧЗТ при исследовании микобактериальных аллергенов/ Ю.М. Мясоедов, А.Х. Найманов// Ветеринария и кормление.- 2015.- №2.- с. 28-31.

95. Мясоедов, Ю.М. Оценка методов контроля качества микобактериальных аллергенов изготавливаемых с использованием *M. bovis*/ Ю.М. Мясоедов // Вестник КГСХА.- 2015.- №8.- С. 209-212.

96. Мясоедов Ю.М. Сравнительный анализ критериев формирования групп морских свинок используемых для моделирования реакций гиперчувствительности замедленного типа / Ю.М. Мясоедов// Вестник КГСХА, №7 2013 г. С.66-67.

97. Мясоедов Ю.М. Изучение развития туберкулезного процесса на модели морских свинок инфицированных мутантными по *RD-1* региону микобактериями/ Ю.М. Мясоедов, В. В. Пузанова// Биомедицина.- 2014.-№ 4.- С. 40-46.

98. Мясоедов Ю.М. Разработка критерия формирования групп морских свинок используемых в тестах туберкулиновой гиперчувствительности

замедленного типа/ Ю.М. Мясоедов, М.И. Искандаров //Ветеринарный врач.- 2014.-№ 2 (22).- С.56-61.

99. Мясоедов Ю.М. Подбор условий и критериев оценки биологической активности и специфичности аллергена очищенного комплексного из атипичных микобактерий/Ю.М. Мясоедов, В.М. Безгин, В.Е. Козлов // Биомедицина.- 2015.- №1.- С. 54-59.

100. Мясоедов Ю.М. Изучение биологических свойств микобактериальных фракций *M. bovis* и *M. avium*/ Ю.М.Мясоедов, В.М. Безгин, В.Е. Козлов // Вестник КГСХА.- 2016.- №6.- С. 65-69.

101. Мясоедов Ю. М. Модификация метода оценки кожной реакции ПЧЗТ при контроле микобактериальных аллергенов/ Ю. М. Мясоедов // Вестник КГСХА.-2016.-№9.-С.157-161.

102. Мясоедов Ю. М. Разработка программного обеспечения статистического анализа показателей качества туберкулина очищенного (ППД) для млекопитающих/ Ю. М. Мясоедов // Вестник КГСХА.-2016.-№9.-С.144-147.

103. Мясоедов Ю. М. Автоматизированный анализ параметров крови лабораторных животных/ Ю. М. Мясоедов // Вестник КГСХА.-2017.-№5.-С.25-28.

104. Мясоедов Ю. М. Изучение параметров крови морских свинок сенсibilизированных инактивированными микобактериями *M. bovis* при моделировании туберкулёзной инфекции/ Ю. М. Мясоедов// Вестник КГСХА.- 2017.-№7.-С.33-36.

105. Мясоедов Ю. М. Оценка методов контроля качества аллергенов микобактерий *M. avium-intracellulare* и *M. scrofulaceum*/ Ю. М. Мясоедов // Вестник КГСХА.-2017.-№6.-С.19-25.

106. Мясоедов Ю. М. Изучение различных способов сенсibilизации морских свинок микобактериями *M. avium* для оценки иммунобиологических параметров ППД туберкулинов/ Ю. М. Мясоедов // Вестник КГСХА. -2018. -№4. - С.140-143.

107. Мясоедов Ю. М. Модифицированная симультанная аллергическая проба на крупном рогатом скоте при диагностике микобактериальных инфекций/ Ю. М. Мясоедов // Вестник КГСХА. -2018. -№5. -С.120-125.

108. Мясоедов Ю. М. Оценка различных вариантов сенсибилизации морских свинок атипичными микобактериями/ Ю. М. Мясоедов / Ю. М. Мясоедов // Вестник КГСХА. -2018. -№6. -С.95-98.

109. Мясоедов Ю. М. Изучение динамики гематологических изменений у морских свинок при моделировании туберкулезной инфекции опосредованной низко вирулентными микобактериями/ Ю. М. Мясоедов // Вестник КГСХА. -2018. -№3.-С.92-95.

110. Мясоедов Ю. М. Изучение сенсибилизирующих свойств атипичных микобактерий разных групп по классификации *Ranyon*/ Ю. М. Мясоедов, А.Х. Найманов // Ветеринария и кормление.- 2019.-№4.- С.6-8.

111. Мясоедов Ю. М. Некоторые аспекты иммунопатогенеза туберкулеза (обзорная статья)/ Ю. М. Мясоедов, И. Ю. Ездакова, А.Х. Найманов // Актуальные вопросы ветеринарной биологии.- 2020.- Т.45.-№1.- С.12-21.

112. Наставление по диагностике паратуберкулеза (паратуберкулезного энтерита) животного // Утв. Департаментом Ветеринарии МСХ РФ от 05. 04. 2001. № 13-5-02/0050.-20с.

113. Наставление по диагностике туберкулеза животных. Утверждено Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ 18 ноября 2002 г. - М. - 2002 г. - 63 с.

114. Найманов, А.Х. Совершенствование аллергической диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота: специальность 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Найманов Али Хусинович; Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии ВАСХНИЛ.-Москва, 1981.-17с. – Место защиты: Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии ВАСХНИЛ. – Библиогр.: с. 16–17.



115. Найманов, А.Х. Применение диагностических тестов в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах / А.Х. Найманов, Р.А. Нуратинов, И.С. Дубовой // Ветеринария. – 1990. – № 1. – С. 31-33.

116. Найманов, А.Х. Сравнительная оценка туберкулинов для млекопитающих СССР и Франции / А.Х. Найманов, Т.Г. Байтубаев, Г.И. Наурзбеков // Бюллетень ВИЭВ.- Москва: ВИЭВ, 1990. – Вып. 73-74. – С. 24-29.

117. Найманов, А.Х. Применение «booster effect» при диагностике туберкулеза для довыявления больных туберкулезом животных / А.Х. Найманов, В.И. Косенко, И.С. Дубовой // Труды. ВИЭВ. – Москва: ВИЭВ, 1991. – Т. 69. – С. 136-144.

118. Найманов, А.Х. Применение BOOSTER EFFECT при диагностике туберкулеза для довыявления больных туберкулезом животных / А.Х. Найманов, В.И. Косенко, И.С. Дубовой. // Труды ВИЭВ.- Москва: ВИЭВ, 1991. – Т.69. –С.136- 139.

119. Найманов, А.Х. Туберкулез крупного рогатого скота при естественном и искусственном заражении/ А.Х. Найманов, В.И. Косенко, О.В. Якушева// Труды ВИЭВ.- Москва: ВИЭВ, 1991.- Т.69.- С.129-136.

120. Найманов А.Х. Аллергическая диагностика микобактериальных инфекций крупного рогатого скота: специальность 16.00.03«Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / Найманов Али Хусинович; Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии ВАСХНИЛ. -Москва, 1993.-23с. – Место защиты: Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии ВАСХНИЛ. – Библиогр.: с. 22–23.

121. Найманов, А.Х. Реакция клеточного иммунитета при экспериментальном и естественном заражении туберкулезом овец / А.Х. Найманов, Н.П. Овдиенко, Л.Н. Черноусова и др.// Актуальные проблемы бруцеллеза и туберкулеза животных: Сборник научных трудов ВНИБТЖ. – Омск: ВНИБТЖ, 2000.– С.112-119.

122. Найманов, А.Х. Дифференциация аллергических реакций на туберкулин / А.Х. Найманов // Ветеринария. – 2002. – № 3. – С. 10-13.
123. Найманов, А.Х. Проблемы диагностики и профилактики туберкулёза крупного рогатого скота в современных условиях/ А.Х. Найманов //Ветеринарная патология. -2004.-№1-2 (9). С.-18-23.
124. Найманов, А.Х. Определение  $\gamma$ -интерферона для диагностики туберкулеза / А.Х. Найманов, О.А. Верховский, О.А. Савицкая [и др.]//Ветеринарная патология. – 2004. –№6. – С.19-22.
125. Найманов, А.Х. ПЦР при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота / А.Х. Найманов, Н.П. Овдиенко, Е.П. Осипова [и др.]// Ветеринарная патология. – 2004. –С.19-23.
126. Найманов, А.Х. Проблемы диагностики и профилактики туберкулеза крупного рогатого скота в современных условиях/ А.Х. Найманов. // Ветеринарная патология. – 2004. -№1-2(9). –С.18-23.
127. Найманов А.Х., Гулюкин М.И. Микобактериальные инфекции крупного рогатого скота. Москва, «Зооветкнига» 2014, 235с.- ISBN: 978-5-6045650-8-7.
128. Найманов А.Х. Микобактериальные инфекции крупного рогатого скота (туберкулёз и паратуберкулёз)/ А.Х. Найманов, М.И. Гулюкин.- Москва: Зооветкнига, 2014.- 235 с.-ISBN 978-5-905106-40-8.
129. Найманов, А.Х. Проблемы диагностики паратуберкулеза крупного рогатого скота / А.Х. Найманов, Н.Г. Толстенко, Е.П. Вангели, [и др.]// Ветеринария и кормление. –2014. –№ 3. –С.10-12.
130. Найманов, А.Х. Микобактериальные инфекции крупного рогатого скота (туберкулёз, паратуберкулёз)/ А.Х. Найманов, М.И. Гулюкин.- Москва: Зооветкнига, 2014.- 235 с.- ISBN 978-5-905106-40-8.
131. Найманов, А.Х. Вакцинопрофилактика туберкулеза/ А.Х. Найманов, В.М. Калмыков, М.С. Калмыкова // Ветеринария. - 2018. -№10.- С.3-7.

132. Найманов, А.Х. Туберкулез животных (учебник для ВУЗов, специальная литература)/ А.Х. Найманов, В.М.Калмыков.- Санкт-Петербург: Лань, 2018, -504 с.- ISBN 978-5-8114-2792-5

133. Найманов, А.Х. Морская свинка – лабораторная модель при туберкулёзе животных/ А.Х. Найманов, В.М. Калмыков, М.С. Калмыкова// Труды ВИЭВ.- Москва: ВИЭВ, 2018.- Т.80 (часть II).- С.261-267.

134. Найманов, А.Х. Контроль благополучия крупного рогатого скота по туберкулёзу в современных условиях/ А.Х. Найманов, А.А. Муковнин, Н.И. Целуева// Ветеринария.- 2018.- № 7.-С. 3-7.

135. Найманов, А.Х. Воспроизведение туберкулёза на лабораторных животных (биологическая проба)/ А.Х. Найманов, В.М. Калмыков, М.С. Калмыкова// Ветеринария, зоотехния и биотехнология.- 2018.- № 5.-С. 24-30.

136. Найманов, А.Х. Аллергены и аллергическая диагностика микобактериальных инфекций животных/ А.Х. Найманов, Ю. М. Мясоедов; ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН».- Курск, 2020.- 238 с.- ISBN 978-5-907167-74-2.

137. Найманов, А.Х. Туберкулины для млекопитающих, стабильность биологических свойств старого альттуберкулина Коха (Германия) после длительного хранения/ А.Х. Найманов, Ю.М. Мясоедов// Ветеринария и кормление.-2021.-С.25-29.

138. Нечаева Л.А. Изучение туберкулиновых препаратов, изготовленных с применением ионизирующих излучений: специальность 03.00.07 «Микробиология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Нечаева Людмила Александровна; Казанский ветеринарный институт имени Н. Э. Баумана.- Казань, 1975.- Место защиты: Казанский ветеринарный институт имени Н. Э. Баумана.- Библиогр.: с. 19–20.

139. Новожилова И.А. Микобактериозы / И.А. Новожилова// Проблемы туберкулёза и болезней лёгких. – 2004. – № 9. – С. 3 – 9.

140. Нуратинов, Р.А. Выявление больных туберкулезом животных, анергичных к туберкулину / Р.А. Нуратинов // Сборник научных трудов Северокавказского и Прикаспийского НИВИ. – Новочеркасск: Северокавказский и Прикаспийский НИВИ, 1987. – С. 18-26.

141. Нуратинов Р.А. Выявление больного туберкулезом крупного рогатого скота в состоянии анергии к туберкулину: специальность 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Нуратинов Рамазан Абдулвагабович; Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии ВАСХНИЛ.- Москва, 1987.-23с. – Место защиты: Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии ВАСХНИЛ. – Библиогр.: с. 19–20.

142. Нуратинов, Р.А. Внутривенная туберкулиновая проба в диагностике туберкулеза крупного рогатого скота / Р.А. Нуратинов // Тезисы докл. 3-й респуб. науч.-практ. конф. - Гродно, 1987. - С. 89.

143. Нуратинов, Р.А. Способность нокардий сенсibiliзировать животных к туберкулину (экспериментальное заражение кроликов микобактериями и нокардиями музейных штаммов) / Р.А. Нуратинов, М.Н. Магомедов // Ветеринария. – 1996. – № 5. – С. 27-30.

144. Нуратинов, Р.А. Кислотоустойчивые микроорганизмы - микобактерии, нокардии, родококки: химический состав, биологические свойства, антигенная структура / Р.А. Нуратинов, М.О. Ургуев, М.О. Боратов // Проблемы туберкулеза. – 2001. – № 5. – С. 54-57.

145. Нуратинов, Р.А. Изучение сенсibiliзирующих к туберкулину свойств нокардий и родококков / Р.А. Нуратинов, М.О. Боратов, И.В. Эфендиева // Ветеринария. – 2001. – № 11. – С. 23-27.

146. О кратности введения туберкулина крупному рогатому скоту / Н.П. Овдиенко, В.Е. Щуревский, А.Х. Найманов [и др.]// Ветеринария. – 1987. – № 8. – С. 29-33.

147. Обоснование создания комплексных аллергенов для дифференциальной диагностики туберкулёза / А.Х. Найманов, Г.И. Устинова, Н.Г. Толстенко [и др.] // Ветеринария и Кормление.- 2018.- № 5.-С. 6-8.

148. Овдиенко, Н.П. Моноштаммные туберкулины для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / Н.П. Овдиенко, Г.Ф. Коромыслов, В.Е. Щуревский, Г.И. Устинова // Бюллетень ВИЭВ. – Москва: ВИЭВ, 1981. - № 4. - С. 6-8.

149. Овдиенко, Н.П. Сравнительное испытание туберкулинов для млекопитающих и для птиц на крупном рогатом скота / Н.П., Овдиенко В.Е. Щуревский, А.Х. Найманов и др. // Труды ВИЭВ. – Москва: ВИЭВ, 1985. – Т. 62. - С. 8-20.

150. Овдиенко, Н.П. Сравнительная оценка активности ППД туберкулинов для млекопитающих производства СССР, ЧССР и ГДР / Н.П. Овдиенко // Актуальные проблемы туберкулеза и бруцеллеза с.-х. животных. – Новосибирск, 1989. – С. 35-40.

151. Овдиенко, Н.П. Эпизоотология и диагностика туберкулеза крупного рогатого скота в условиях интенсификации животноводства: специальность 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология» и 16.00.04 «Ветеринарная фармакология с токсикологией»: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / Донченко Николай Александрович; Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока.- Новосибирск, 1990.-49 с. – Место защиты: Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока. – Библиогр.: с. 48–49.

152. Овдиенко, Н.П. Оптимальная диагностическая доза ППД-туберкулина для млекопитающих / Н.П. Овдиенко, А.Х. Найманов, Д.М. Мирзоев // 100 лет Курской биофабрике и агrobiологической промышленности России: Тез. докл. науч.-произв. конф. Курск, 1996. – С. 229-230.

153. Овдиенко, Н.П. Мониторинг туберкулеза крупного рогатого скота в зоне радиоактивного загрязнения / Н.П. Овдиенко, В.Д. Сыпин, В.Ю. Кассич // Ветеринария. – 2002. – № 3. – С. 5-10.

154. Овдиенко, Н.П. ППД туберкулин для птиц при аллергической диагностике паратуберкулёза крупного рогатого скот// Овдиенко Н.П., Найманов, А.Х.// Тезисы докладов к 100 - летию Курской биофабрики.-Курск.-1996.-С.219-220.

155. Оздоровление неблагополучных по туберкулезу хозяйств со смешанной инфекцией / А.Х. Найманов, В.В Пеньков., В.П. Чуйан, [и др.]// Ветеринария. – 2002. – № 2. – С.9-11.

156. Оздоровительные мероприятия при туберкулёзе крупного рогатого скота/ Гулюкин, М.И., Найманов А.Х., Ведерников В. А., [и др.] // Ветеринария. - №1.-2012.-С.3-8.

157. Оптимальная диагностическая доза ППД туберкулина для млекопитающих в МЕ при биологической пробе на лабораторных животных/ Ю.М. Мясоедов, В.М. Безгин, В.Е. Козлов, А.Х. Найманов// Ветеринария и кормление. - 2016.- №6.- С.31-33.

158. Опыт биофабричного производства и сравнительное испытание диагностической ценности сухого туберкулина УИЭВ и АТК / Говоров А.М., Осташко Ф.И. Шеин А.Н. и др. // Научные труды УИЭВ. Харьков: Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины, 1959. – Т. 25. – С. 221-230.

159. Определение уровня иммуноглобулинов у больных туберкулезом легких. Е.В. Истомина, А.А. Старшинова, И.В Чернохаева. [и др.]// Медицинская иммунология. -2017.-т.19.-С.141-142.

160. Определение активности эталонной серии туберкулина (ППД) для птиц относительно первого международного стандарта туберкулина (*PPD*) *M. avium*/ В.Е. Козлов, В.М. Безгин ... Мясоедов Ю.М. [и др.] // Ветеринарная патология. Современные проблемы диагностики и профилактики туберкулёза животных.- 2004.- №1-2 (9). С. 89-92.

161. Оптимальная диагностическая доза ППД туберкулина для млекопитающих в международных единицах (МЕ) при биологической пробе на лабораторных животных/ Ю. М. Мясоедов, В. М. Безгин, В.Е. Козлов, А.Х. Найманов // Ветеринария и кормление.- 2016.- №6.- С.35-37.

162. Освоение метода получения «очищенного» туберкулина и изучение его активности / М.М. Иванов, М.А. Бабич, В.А. Плотникова и др. // Труды ГНКИ ветеринарных препаратов. Москва: ГНКИ ветеринарных препаратов, 1959. – Т. 8. – С. 15-25.

163. Основные проблемы и совершенствование диагностики туберкулеза крупного рогатого скота/ А.Х. Найманов, Н.Г. Толстенко, Е.П. Вангели [и др.] // Ветеринария и кормление. - 2014.- №2.- С.6-9.

164. Осташко, Ф.И. Туберкулин, изготовленный на синтетической питательной среде / Ф.И. Осташко // Научные труды УИЭВ. Харьков: Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины, 1953. – Т. 20. – С. 126-131.

165. Официальный бюллетень Европейских Сообществ EN№ L 109/23 (107.25.4.97).

166. Официальный бюллетень Европейских Сообществ EN № L 109/4 (166.25.4.97).

167. Оценка активности национального стандарта туберкулина (ППД) для млекопитающих относительно 1-го международного стандарта туберкулина (*PPD*) *bovine*/ В.Е. Козлов, В.М. Безгин, К.В. Шумилов, Н.К. Букова, А.Х. Найманов, Ю.М. Мясоедов [и др.] // Ветеринарная патология. Современные проблемы диагностики и профилактики туберкулёза животных.- 2004.- №1-2 (9). С. 85-89.

168. Пальпебральная проба при туберкулезе крупного рогатого скот/ Н.П. Овдиенко, Р.А. Нуратинов, А.Х. Найманов [и др.] // Ветеринария.- 1987.- №5.- С. 32-33.

169. Паратуберкулез крупного рогатого скота в Российской Федерации/ А.А. Муковнин, А.Х. Найманов, Н.Г. Толстенко, [и др.] // Ветеринария.- 2021. - № 4. – С. 3-7.

170. Падалица, А.М. Факторы неспецифической реактивности крупного рогатого скота к туберкулину, способы их выявления и устранения: специальность 16.00.03–«Ветеринарная эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Падалица Александр Михайлович; Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и дальнего Востока.- Новосибирск, 1998.- 19с. – Место защиты: Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и дальнего Востока.- Библиогр.: с. 18–19.

171. Пальпебральная проба при туберкулезе крупного рогатого скот/ Н.П. Овдиенко, Р.А. Нуратинов, А.Х. Найманов [и др.] // Ветеринария.- 1987.- №5.- С. 32-33.

172. Патент № 2113233 Российская Федерация, МПК А 61К 39/00 (1997.07). Способ получения туберкулина: № 97111842/13: заявлено 04.07.1997: опубликовано 20.06.1998/ Козлов В.Е. [и др.] заявитель и патентообладатель Курская биофабрика- фирма БИОК.-7с. :ил.

173. Патент № 2274473 Российская Федерация, МПК61К 39/04 (2006.04). Способ диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота; № 2004120531/13: заявлено 05.07.2004; опубликовано 20.04.2006/ Виктор А. Л [и др.] заявитель и патентообладатель Всероссийский научно-исследовательский институт пантового оленеводства (ВНИИПО).-6с. :ил.

174. Патент № 2376030 Российская Федерация, МПК А 61К 39/04 (2008.06). Способ оценки эффективности туберкулиновых проб в диагностируемой группе крупного рогатого скота: 2008122677/13: заявлено 04.06.2008; опубликовано 20.12.2009/ Блинов В. А. [и др.] заявитель и патентообладатель Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова"-10с. :ил.



175. Патент №2366454 Российская Федерация, МПК А 61К 39/04 (2009.09). Способ ранней диагностики туберкулеза животных: 2007128465/13: заявлено 24.07.2007; опубликовано 27.01.2009/ Дубовой Б.Л. [и др.] заявитель и патентообладатель Государственное научное учреждение «Северо- Кавказский зональный научно- исследовательский ветеринарный институт» -12с. :ил.

176. Патент № 2295356 Российская Федерация, МПК А 61К 39/04 (2006.01). Способ диагностики туберкулеза крупного рогатого скота: 2005123074/13: заявлено 20.07.2005; опубликовано 20.03.2007/ Сысоев В. А., Луницын В. Г. заявитель и патентообладатель Всероссийский научно-исследовательский институт пантового оленеводства (ВНИИПО)- 5с. :ил.

177. Патент №2150883 Российская Федерация, МПК А 61К 39/04 (1998.06). Способ определения морфологических количественных параметров рельефа поверхности биологических объектов: кожи, ногтей, волос, костей, хрящей, зубов и других: 98110955/14: заявлено 09.06. 1998; опубликовано 20.06.2000/ Омеляненко Н.П., Соколов В.Н., Юрковец Д.И. заявитель и патентообладатель Омеляненко Н.П., Соколов В.Н., Юрковец Д.И.- 8с. :ил.

178. Патент №2451333 Российская Федерация, G06F 17/40 (2006.01) Устройства и способы формирования изображений для захвата и анализа цифровых изображений кожи: 2009116640/08: заявлено 01.10.2007; опубликовано 20.05.2012/ Д. Д. Коллиас заявитель и патентообладатель Джонсон энд Джонсон Конзьюмерз компаниз инк.- 17с. :ил.

179. Пландер, Э.М. Увеличение алергизирующих и иммуногенных свойств вакцины БЦЖ путем кратковременного озвучивания ее ультразвуком / Пландер Э.М. // Вопр. общей и мед. микробиологии: Изд. Акад. Наук Латв. ССР. – Рига, 1960. – С. 48-52.

180. Платэ, Н.А. Мембранные технологии - авангардное направление развития науки и техники XXI века. / Н.А. Платэ // Крит. технол. Мембраны. – 1999. – № 1. – С. 4-13.

181. Полимеразная цепная реакция (система *senX3-regX3*) при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота/ А.Х. Найманов, Н.П. Овдиенко, Е.П. Осипова [и др.] // Ветеринарная патология.- 2004.- №1-2(9).- С. 96-99.

182. Помыканов Н.П. Совершенствование диагностики туберкулеза крупного рогатого скота в индивидуальных и общественных хозяйствах Специальность: 16.00.03—«Ветеринарная эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук /Помыканов Николай Петрович; Институт экспериментальной ветеринарии.- Москва, 2005.- 23 с.- Место защиты: Институт экспериментальной ветеринарии.- Библиогр.: с. 22–23.

183. Проба с диаскинтестом при диагностике туберкулеза животных/ А.Х. Найманов, А.М. Гулюкин, Н.Г. Толстенко [и др.] // Туберкулез и болезни легких.- 2020. - № 12.- Т. 98. – С.53-56.

184. Проблемы микобактериальных инфекций крупного рогатого скота/ А.Х. Найманов, Г.И. Устинова, Н.Г. Толстенко [и др.] // Ветеринария.- 2014.- № 6.-С. 3-8.

185. Проблема неспецифических реакций на туберкулин и совершенствование симультанной пробы для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / А.Х. Найманов, Г.И.Устинова, Н.Г. Толстенко [и др.] // Ветеринария.- 2015. - № 6. – С. 20-25.

186. Проблемы диагностики микобактериальных инфекций крупного рогатого скота/ А.Х. Найманов, Н.П. Овдиенко, Е.П. Вангели [и др.] // Ветеринарная.- 2014.- №6.- С. 3-8.

187. Проблемы диагностики паратуберкулеза крупного рогатого скота/ А.Х. Найманов, Н.П. Овдиенко, Е.П. Вангели [и др.] // Ветеринария и кормление.- 2014.- №3.- С. 10-12.

188. Профилактика и меры борьбы с паратуберкулёзом животных/Н.П. Овдиенко, А.Х. Найманов, Н.Г. Толстенко. [и др.]// Ветеринария.-2007.- №12.-С.3-7.

189. Раджабов, Х.Б. Бактериологическая диагностика туберкулёза крупного рогатого скота и видовая принадлежность нетуберкулёзных микобактерий, выделенных в республике Таджикистан: специальность 06.02.02– «Ветеринарная эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук /Раджабов Хикматулло Исмаатович; Кубанский государственный аграрный университет. Краснодар, 2016.- 26 с.- Место защиты: Кубанский государственный аграрный университет.- Библиогр.: с. 25–26.

190. Разработка иммунозолотых диагностических систем для идентификации возбудителя туберкулёза *in situ*/ С.А. Староверов, И.В. Видяшева, А.С. Фомин, [и др.]//Российский ветеринарный журнал мелкие домашние животные. - 2011. -№2. - С. 51-58.

191. Результаты испытания ППД- туберкулина для млекопитающих в дозе 5000 ТЕ / Лысенко А.П., Григорьев М.М., Обьедков Г.А. и др. // Вет. наука – производству: Научные труды института экспериментальной ветеринарии С.Н. Вышелесского. – Минск: ИЭВ, 1988. – Вып. 33. – С. 47-50.

192. Рецидивы туберкулёза/ Ю.Я. Кассич, И.К. Целлариус, А.Е. Тесля. Ветеринария.- 1981, №4.- С.38-39.

193. Сенсibiliзирующие свойства НТМБ 4-й группы по классификации Раньена/ А.Х. Найманов, Г.И.Устинова, Н.Г. Толстенко [и др.] // Ветеринария и кормление.- 2014. - № 5. – С. 71-73.

194. Совершенствование симультанной туберкулиновой пробы для дифференциации неспецифических реакций у крупного рогатого скота/ А.Х. Найманов, Г.И. Устинова, Н.Г. Толстенко [и др.] // Ветеринария и Кормление.- 2016.- № 1.-С. 11-13.

195. Совершенствование учета симультанной пробы с ППД-туберкулином для млекопитающих и КАМ/ А.Х. Найманов, Н.Г. Толстенко, Е.П. Вангели, Ю.М. Мясоедов// Ветеринария.-2022.-№10.-С.-24-28.

196. Спиридонова, Г.Г. Значение некоторых диагностических тестов в дифференциации туберкулиновых реакций/ Г.Г. Спиридонова // Научное

обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве.- Новосибирск, 1999.- С. 273-275.

197. Спиртовое фракционирование очищенного сухого туберкулина с характеристикой химических и биологических свойств его фракций / М.А. Линникова, Б.А. Лянда-Геллер, А.Ф. Шумахер, [и др.]// Вопр. прикладной химии. – М., 1960. – С. 221-242.

198. Сравнительная оценка некоторых синтетических питательных сред для изготовления сухого очищенного туберкулина для птиц / М.М. Иванов, А.А. Гринев, А.Н. Шаров и др. // Труды ГНКИ ветеринарных препаратов. – Москва: ГНКИ ветеринарных препаратов, 1973. – Т. 19. – С. 62-65.

199. Сравнительная оценка туберкулиновых реакций линейкой и термографической пленкой у морских свинок с гистологическим изучением папулы / В.П. Костромина, О.Т. Донец, Е.И. Суслов, [и др.]// Пробл. туберкулеза. – 1989. – №7. – С.48-51.

200. Сравнительная оценка эффективности аллергенов при диагностике паратуберкулёза крупного рогатого скота: специальность 16 00 03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой кандидата ветеринарных наук / Головченко Маргарита Вячеславовна; Институт экспериментальной ветеринарии.- Москва, 2006.- 29 с.- Место защиты: Институт экспериментальной ветеринарии.- Библиогр.: с. 28–29.

201. Справочник биохимика/ Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. Москва.: Мир, 1991. - 544с.- ISBN 5-03-001032-7.

202. Сравнительное испытание активности отечественных и зарубежных туберкулинов для млекопитающих / Н.П. Овдиенко, А.Х. Найманов, Э.С. Плотников [и др.]//Ветеринария. – 1989. – № 10. – С. 21-24.

203. Стандартизация сухого очищенного туберкулина / Иванов М.М., Шаров А.Н., Беляев А.С. [и др.]//Труды ГНКИ вет. препаратов. – 1972. – Т. 18. – С. 20-28.

204. СТО 00482909-0011-2011. Туберкулин очищенный ППД для птиц. – Курск, 2011. -25 с.

205. СТО 00482909-0021-2006. Аллерген очищенный комплексный из атипичных микобактерий (КАМ). – Курск, 2007. -29 с.

206. СТО 00482909-0001-2011. Туберкулин очищенный ППД для млекопитающих. – Курск, 2011. -25 с.

207. Суханов, И.П. Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота с применением полимеразной цепной реакции: специальность 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Суханов Игорь Павлович; Всероссийский научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов. Москва, 1999.- 25.- с.- Место защиты: Всероссийский научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов.- Библиогр.: с. 24–25.

208. Таллер, Л.А. Совершенствование лабораторных методов выделения и идентификации микобактерий туберкулеза у крупного рогатого скота: специальность 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Таллер Любовь Аркадьевна; Российской академии сельскохозяйственных наук института ветеринарной медицины Омского аграрного университета.- Омск, 1995. – 19 с. – Библиогр.: с. 18–19.

209. ТУ 10- 19- 518-87. Аллерген сухой очищенный комплексный из атипичных микобактерий (КАМ). Технические условия. Москва.- 1987.-19с.

210. Туберкулез животных и меры борьбы с ним / Ю.А. Кассич, А.Т. Борзяк, А.Ф. Кочмарский [и др]. – Киев: Урожай, 1990. – 304 с. - ISBN 5-337-00539-1.

211. Туберкулез сельскохозяйственных животных / А.М. Колычев, Ю.А. Кассич, О.В. Мартма [и др]. – М.: ВО Агропромиздат, 1991. – 256 с. - ISBN 5-10-001381-8.
212. Туберкулин сухой очищенный ППД для птиц. Технические условия. ТУ 46-876-73. 7с.
213. Туберкулинизация крупного рогатого скота безыгольным инъектором / Д.Д. Новак, Н.В. Душенин, Б.В. Смоляров, [и др.]// Ветеринария. – 1974. – № 5. – С. 58-60.
214. Федоров, Ю.Н. Методические рекомендации по количественному определению и оценке функциональной активности иммунокомпетентных клеток животных/Федоров Ю.Н., Ездакова И.Ю.//Сборник «Новые методы исследований по проблемам ветеринарной медицины».-2008- том 4.- с. 144-158.- Библиогр.: с.157-158.
215. Финкель, Е.А. Биологический метод исследований при туберкулезе/ Е.А. Финкель, Л.В. Михайлова.- Фрунзе: Кыргызстан, 1976.- 158 с.
216. Фрадкин, В.А. Диагностические и лечебные аллергены/ В.А. Фрадкин. - М.: Медицина 1990. С. 51-58.- ISBN 5-225-00722-8.
217. Хасанов Н.Р. Совершенствование дифференциальной диагностики туберкулёза крупного рогатого скота: специальность 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Хасанов Нахтулло Рахматович; Таджикский НИИВИ.- Душанбе, 2001.-24с. – Место защиты: Таджикский НИИВИ. – Библиогр.: с. 21–23.
218. Хаитов, Р.М. Иммунология / Р.М. Хаитов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 320 с.
219. Ходун, Л.М. Выделение атипичных микобактерий от не реагирующих на туберкулин животных / Л.М. Ходун // Ветеринария. – 1990. – № 6. – С. 29-30.
220. Ходун, Л.М. Выделение атипичных микобактерий от животных благополучных и неблагополучных по туберкулезу хозяйств / Ходун Л.М. //

Разработка средств и методов борьбы с туберкулезом животных. – Новосибирск. – 1990. – С. 124-132.

221. Хронические инфекции животных Туберкулёз: монография/ А.Х. Найманов, Е.П. Вангели, Ю.М. Мясоедов [и др.]. -Москва: Спутник+,2022.- 320с. -ISBN 978-5-9973-6280-5.

222. Хронические инфекции животных. Паратуберкулез : монография/ А.Х. Найманов, Е.П. Вангели, Ю.М. Мясоедов [и др.]. -Москва: Спутник+,2022.- 126 с.- ISBN 978-5-9973-6279-9.

223. Шаров, А.Н. Сенсibiliзирующие и аллергенные свойства атипичных кислотоустойчивых микобактерий / Шаров А.Н. // Труды ГНКИ ветеринарных препаратов. – Москва: ГНКИ ветеринарных препаратов, 1969. – Т. XVI. – С. 153-158.

224. Шаров, А.Н. Парааллергические реакции на туберкулин у крупного рогатого скота / Шаров А.Н., Иванов М.М. // Труды ГНКИ ветеринарных препаратов. – Москва: ГНКИ ветеринарных препаратов, 1969. – Т. XVI. – С. 159-166.

225. Шаров, А.Н. К вопросу дифференциации специфических и парааллергических реакций на туберкулин: специальность 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Шаров Александр Николаевич; Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии ВАСХНИЛ.- Москва, 1970.-24с. – Место защиты: Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии ВАСХНИЛ. – Библиогр.: с. 22–23.

226. Шаров, А.Н. Комплексный аллерген из атипичных микобактерий/ А.Н. Шаров, Э.С. Плотников // Ветеринария.- 1980.- №5.- С. 41-43.

227. Шаров, А. Н. Препараты для диагностики туберкулёза у животных. Курская биофабрика 100- лет 1896-1996.-/ А. Н. Шаров, И. А. Бакулов; Курск: Изд-во ГУИПП «Курск», 1996. – С. 374- 383.- ISBN 5-7277-0133-3.

228. Шаров А.Н. Аллергическая диагностика туберкулеза у животных: повышение ее эффективности: специальность 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / Шаров Александр Николаевич; Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии ВАСХНИЛ.-Москва, 1989.-37с. – Место защиты: Всесоюзный институт экспериментальной ветеринарии ВАСХНИЛ. – Библиогр.: с. 36–37.

229. Шевырёв, Н.С. Биологическая и химическая характеристика и стандартизация туберкулинов, изготовленных различными способами: специальность 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Шевырев Николай Стефанович; Харьковский зооветеринарный институт.- Харьков, 1971.-25 с. – Библиогр.: с. 25.

230. Шевырев, Н.С. Совершенствование промышленной технологии сухого очищенного туберкулина для млекопитающих/ Шевырев Н.С. // Труды ГНКИ ветеринарных препаратов.- Москва: ГНКИ ветеринарных препаратов. – 1972. – Т. XVIII. – С. 192-202.

231. Шевырев, Н.С. Введение в ветеринарную иммунологию. Учебное пособие. / Н.С. Шевырев. – Курск: Изд-во КГСХА, 1999. – 249 с. -ISBN 5-7369-0150-1

232. Щуревский, В.Е. Паратуберкулез сельскохозяйственных животных / В.Е. Щуревский – М.: Колос, 1972. – 128 с.

233. Экономический ущерб от туберкулеза крупного рогатого скота в России / Ю.И. Смолянинов, А.С. Донченко, С.Ю. Смолянинов [и др.]// Вет. консультант. – 2005. – № 1. – С. 3-5.

234. Эпизоотический процесс туберкулеза крупного рогатого скота в зависимости от вирулентности *M. bovis* / А.Х. Найманов, И.В. Солодова, Н.Г. Толстенко, О.В. Якушева //Труды ВИЭВ.- Москва: ВИЭВ, 2013.- Т.77.- С.103-110.



235. Юдин, Г.А. Парааллергические туберкулиновые реакции при диагностике туберкулеза животных / Г.А. Юдин // Труды ВИЭВ.- Москва: ВИЭВ, 1967. – Т. 33. – С. 292-297.

236. Юдин, Г.А. Значение парааллергии в диагностике туберкулеза животных / Г.А. Юдин // Ветеринария. – 1972. – № 9. – С. 96-98.

237. Юдин, Г.А. Причины, распространение, дифференциация и профилактика неспецифических реакций на туберкулин / Г.А. Юдин // Ветеринария. – 1987. – № 12. – С. 29-32.

238. Яблокова, Т.Б. Экспериментальные и клинико-эпидемиологические основы стандартизации туберкулина: специальность 03.00.07 «Микробиология» автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Яблоков Татьяна Борисовна; Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза.- Москва, 1969.- 48 с. – Библиогр.: с. 46–47.

239. Ярилин, А.А. Основы иммунологии / А.А. Ярилин. – Москва: Медицина, 1999. – 608 с. -ISBN 5-225-02755-5.

240. A comparison of commercially available PPDs: practical considerations for diagnosis and control of bovine tuberculosis/ D. Bakker, P. Willemsen, S. Strain, J. McNair, 2009:.. M. bovis V Conference, Wellington, New Zealand, proceedings p. 92.

241. A comparison of the relative potencies of various bovine PPD tuberculins in naturally infected tuberculous cattle/ J. Haagsma, L. M. O'reilly, R. Dobbler [et. al.] // Journal of Biological Standardization. - 1982.- N 4.- P. 273–284.

242. A DNA prime-Mycobacterium bovis BCG boost vaccination strategy for cattle induces protection against bovine tuberculosis/ M.A. Skinner, B.M. Buddle, D.N. Wedlock [et.al] // Infect. Immun.-2003.-Vol. 71.-P.4901–4907.

243. Amr, M.M. Tuberculin Skin Test for Control of Bovine Tuberculosis: Limitation History, Current Challenges and Future Opportunities/ M.M. Amr// Journal of Microbiology & Experimentation.- 2017.-Vol. 4.- P.1-5.

244. A new model to calibrate a reference standard for bovine tuberculin Purified Protein Derivative in the target species/ K. Frankena, L. Jacobs, T. Dijk [et.al.] // Front Vet Sci. - 2018.-Vol. 5. – P.232.

245. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques/ R. De la Ruedomenech, A.V. Goodchild, H. M. Vordermeier [et.al.] // *Research in Veterinary Science*. -2006.- Vol. 81. P. 190–210.

246. Analysing nonsynonymous mutations between two *Mycobacterium bovis* strains with contrasting pathogenic profiles/ M. Bigi, C.L. Vazques, A.B. Castela [et.al.] // *Veterinary Microbiology*.-2019.-Vol. 239.

247. Anon, 1992: Council Directive 92/65/EEC of 13 July 1992 laying down animal health requirements governing trade in and imports into the Community of animals, semen, ova and embryos not subject to animal health requirements laid down in specific Community rules referred to in Annex A (I) to Directive 90/425/EEC. *Official Journal of the European Communities* 268, P. 54–72.

248. Assay Method for the Evaluation of Koch`s Old Tuberculin. United States Department of Agriculture Center for Veterinary Biologics Testing protocol SAM 604 Supplemental, July 21 2011. - 11p.

249. Bakker D. Quality control of Purified Protein Derivative tuberculins: essential for effective bovine tuberculosis control and eradication programmes/ D. Bakker, M. Good. In: *International Symposium of Veterinary Epidemiology and Economics*. Chiang Mai (2018).

250. Biomarkers of Cell-Mediated Immunity to Bovine Tuberculosis / M.V. Palmer, T.C. Thacker, M.M. Rabideau et al. [et.al] // *Veterinary Immunology and Immunopathology*.-2019.- Vol 12.-P.78-99.

251. Blood-based assays to detect *Mycobacterium bovis*-infected cattle missed by tuberculin skin testing / M. Coad, S.H. Downs, P.A. Durr [et.al.] // *Vet. Rec.*- 2008.- Vol.-162.- P. 382– 384.

252. Bovine natural killer cells restrict the replication of *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages and enhance IL-12 release by infected macrophages/ M Denis., D.L. Keen, N.A. Parlane [et.al.] // *Tuberculosis*.- 2007. - Vol.87.-P. 53–62.

253. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication/

Schiller, B. Oesch, H. M. Vordermeier [et.al] // *Transboundary Emerging Diseases*.- 2010.-Vol.57.-P. 205–220.

254. Burke, D. S. Of postulates and peccadilloes: Robert Koch and vaccine (tuberculin) therapy for tuberculosis/ Burke D. S.// *Vaccine*.- 1993.- Vol. 11(8). P. 795-804.

255. Buslin, S.J. Studies of the dynamics of reactivity to tuberculin and Candida antigen in institute analyzed patients/ S.J. Buslin, J.A. Musprath, G.H. Rossing//*Amer. Rev. resp. Dis*.- 1986.-Vol. 134.-P.-854-858.

256. Cercfary previna valearea diagnostica a tuberculiner purificate de tip manifer heterologe in tuberculosa taurinelor –Lucrarile inat de ceretari veter. si bionrer. Giortea G. et. al. //«Pasteur».- 1973. -№10.-S.187-193.

257. CCR 2 and CXCR3 agonistic chemokines are differently expressed and regulated in human alveolar epithelial cells type II/ D.V. Pechkovsky, T. Goldmann, C. Ludwig [et.al] // *Respir. Res*. -2005.-Vol.-P.1-17.

258. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll- like receptor-2/A.O. Aliprants, R.B. Yang, M.R. Mark [et.al.] // *Science*. - 1999.- Vol.285.- P.736-739.

259. Chambers, M.A. Simple objective measurement of the cutaneous delayed-type hypersensitivity reaction to tuberculin using spectrophotometry / M.A. Chambers, K. Jahans, A. Whelan //*Skin Res Technol*. –2002. May- 8 (2). -P.89-93.

260. Closely related mycobacterial strains demonstrate contrasting levels of efficacy as antitumor vaccines and are processed for major histocompatibility complex class I presentation by multiple routes in dendritic cells/ E. J. Cheadle, L.D. Donnel, P.J. Selby [et.al.] // *Infect Immun*.- 2005.- Vol.- 73(2). P. 784-94.

261. Cor, a novel carbon monoxide resistance gene, is essential for *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis/ V. M. Zacharia, P. S. Manzanillo, V. R. Nair [et. al.] // *mBio*.- 2013.- Nov 19;4(6).- P.721-13.

262. Comparison of tuberculin activity using the interferon-gamma assay for the diagnosis of bovine tuberculosis/ I. Siller, H. M. Vordermeier, W. R. Waters [et.al] // *Veterinary Record*.- 2010.- Vol. 167.-P. 322–326.

263. Comparative evaluation of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) recombinant secretory proteins as DTH marker for paratuberculosis/ M. Jain, A.K. Singh, M.S. Singh [et. al.] // *J. Microbiology Methods*.- 2020.-Vol.175.

264. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages/ C.S. Hirsch, J.J. Ellner, D.G. Russell [et. al.] // *J. Immunol*.- 1994.- Vol.152. -P.743-753.

265. Comparative proteomics identified immune response proteins involved in response to vaccination with heat-inactivated *Mycobacterium bovis* and mycobacterial challenge in cattle / V. Lopez, E. van der Heijden, M. Villar [et.al.] // *Veterinary Immunology and Immunopathology*.- 2018.- Vol.206.- P.54-64.

266. Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on result of a commercial gamma interferon assay for diagnosis of tuberculosis in cattle / Whipple D.L. [et.al] // *J. Vet. Diagn. Invest*.- 2001.- Vol. 13. -№ 2.- P. 117-122.

267. Daniel, T. M. The history of tuberculosis/ T. M. Daniel// *Respir Med*.- 2006.- Vol. 100(11).- P. 1862-1870.

268. Davis, J. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection// J. Davis, L. Ramakrishnan//*Cell*.-2009.-Vol.136.-P.37–49.

269. Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle/C.R. Wyatt, C. Madruga, C. Cluff [et.al] // *Veterinary Immunology and Immunopathology*.-1994.-Vol. 40.- P.187-199.

270. Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity/ A. A. Chackerian, J. M. Alt, T.V. Perera [et.al.] // *Infect. Immun*.- 2002.-Vol.70.-P.4501-4509.

271. Directive 64/432/EEC. Council Directive of 26 June 1964 on Animal Health Problems Affecting Intra-Community Trade in Bovine Animals and Swine (64/432/EEC) as Amended to 27/05/2015. (2015).

272. Drug resistance, fitness and compensatory mutations in *Mycobacterium tuberculosis* / A. K. A. Emane., X. Guo, H. E. [et.al.] // *Tuberculosis (Edinb)*.- 2021.- Vol.129

273. Eicosanoid pathways regulate adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis*/ M. Divangahi, D. Desjardins, C. Nunes-Alves [et.al.] // *Nature Immunol.* -2010.- Vol.11.-P.751–758.

274. European pharmacopeia (2007) Supplement 5.7. Monographs: Tuberculin Purified Derivative. Reference Work for the Quality Control of Medicines in Europe, 04/2007. P. 5129–5130.

275. European Pharmacopoeia 4 th Edition 2002. Council of Europe Strasbourg. -P.2088-2089.

276. Evaluation of the use of a needle-free injection syringe as a cause of non-specific reactions in the intradermal tuberculin test used for the diagnosis of bovine tuberculosis/ A. Diez-Guerrier, A. Roy, M.L. Cruz [et.al] // *Research in Veterinary Science.*- Vol.119.- 2018.- Pages 56-60.

277. Factors affecting intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. 33rd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, European Society of Mycobacteriology / C. Casal, J. Bezos, A. Diez [et.al.]; Brasov, Romania.-2012.

278. Field evaluation of a novel differential diagnostic reagent for detection of *Mycobacterium bovis* in cattle/ P.J. Cockle, S.V. Gordon, R.G. Hewinson [et.al.] // *Clin. Vaccine Immunol.*- 2006.- Vol.13.- P. 1119–1124.

279. Francis, J. The diagnostic of tuberculosis in cattle with special reference to bovine PPD tuberculin/ J. Franci, C.Choi// *Austral. Veter. J.* -1973.-Vol.49.-N5. S.-246-251.

280. Flynn J.L. Mutual attraction: does it benefit the host or the bug?/ J.L. Flynn // *Nat. Immunol.*-2004.-Vol.5.-P.778-779.

281. Gene expression profiling of peripheral mononuclear cells in lame dairy cows with foot lesion / P.E. Almeida, P.S. Weber, J.L. Burton [et.al.] // *Vet. Immunol. Immunopathol.*- 2007.- Vol. 120.-P. 234–245.

282. Good, M. Perspectives on the history of bovine TB and the role of tuberculin in bovine TB eradication/ M. Good, A. Duignan// *Vet Med Int.*- 2011.-V.25. P.1-11.

283. Goossens, S. N. Mechanisms of Drug-Induced Tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*/S. N. Goossens, L. S .Samantha, V. R. Annelies// *Clin Microbiol Rev.* - 2020.- Vol. 34 (1).- P. 1-20.

284. Gradmann, C. Robert Koch and the white death: from tuberculosis to tuberculin/ C. Gradmann// *Microbes Infect.* -2006.-V. 1.- P.294-301.

285. Greenstein, R. Is chronic disease caused by a mycobacterium?/ R. Greenstein// *Lancet. Infect. Dis.*-2003.-N3.-P.507-516.

286. Herrman, J.L. Dendritic cells and *Mycobacterium tuberculosis*: which is the Trojan horse?/ J.L. Herrman P.H. Langrange // *Pathol. Biol.* -2005.-Vol.53(1).- P. 35-40.

287. IL-22 produced by human NK cells inhibits growth of *Mycobacterium tuberculosis* by enhancing phagolysosomal fusion/ R. Dhiman, M. Indramohan, P.F. Barnes [et.al.] // *J. Immunol.* -2009.- Vol.183.- P.6639– 6645.

288. Immunological activity of a 38-kilodalton protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*/ D. Young, L. Kent, A. Rees[et.al] // *J. Infect Immun.*- 1986.-Vol. 54.- P.177-183.

289. Intravital imaging reveals limited antigen presentation and T cell effector function in mycobacterial granulomas/ J. G. Egen, A.G. Rothfuchts, C.G. Feng [et.al.] // *Immunity.* -2011.-Vol.34.-P.807–819.

290. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection/ Khader, S. A., Shabaana A. Khader, S. Partida-Sanchez [et. al.] // *J. Exp. Med.* -2006.-Vol.203.-P.1805–1815.

291. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*/ K. Johanneke, O. Marije, A. B. J. Leo [et. al.] // *Clin. Dev. Immunol.*- . 2011.-V5.-P.1-12.

292. In vitro responsiveness of  $\gamma\delta$  T cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle to mycobacterial antigens: Predominant involvement of WC1+ cells/ J. Smyth, M. D. Welsh, R. M. Girvin [et.al] // *Infect. Immun.*-2001.-Vol. 69.-P.89–96.

293. Innate immune responses to bacterial ligands in the peripheral human lung-role of alveolar epithelial TLR expression and signaling/ A. J. Thorley, D. Grandolfo, E. Lim [et.al] // *PloSOne*.- 2011.-Vol.6.- P.218-227.
294. Johnson, S.R. Use of Infrared Thermography as an Alternative Method to Evaluate the Comparative Cervical Test (CCT) in Cattle Sensitized to *Mycobacterium bovis* or *M. avian*/ S.R. Johnson, M.R. Dunbar; Greensboro; Proceedings of 112th Annual Meeting of the United States Animal Health Association, 2008.- P. 101–102.
295. Khan, H. A. Statistical Methods in Epidemiology// H. A. Khan, C. T. Sempos; Oxford: University Press, 1989.- P. 72–75.
296. Kidd, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease/ P. Kidd// *Altern Med Rev*.- 2003.- 8(3).- P. 223-46.
297. Kincaid, E. Z. *Mycobacterium tuberculosis* exerts gene-selective inhibition of transcriptional responses to IFN- $\gamma$  without inhibiting STAT1 function/ E. Z. Kincaid, J. D. Ernst// *J. Immunol*. -2003.-Vol.171.-P.2042–2049.
298. Koniha, L. Replacement of mammalian tuberculin with *M. bovis* PPD with field for tuberculosis/ L. Koniha//*Am. Ase. Veter. Zabor Diagnost*.-1976.-Vol.19.-P.-345-350.
299. Landi, S. A comparison between two tuberculins, International Standard OT and U.S. Standard OT. / S. Landi, R.L. M. Clure// *Am. Rev. Resp. Dis*.- 1961.-V100.-P. 569–571.
300. Landi, S. Production and standardization of tuberculin (a brief history)/ S. Landi// *Indian J Chest Dis Allied Sci*.- 1982.- 24.-P.78-87.
301. Lack of tuberculin activity of synthetic peptides / I. Toida, S. Yamamoto, S. Takuma [et.al] // *Infect. and Immun*. – 1985. – Vol. 50. – № 3. – P. 614-619.
302. Lin, M. Y. Host-pathogen interactions in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: identification of new targets for tuberculosis intervention/ M. Y. Lin, T. H. M.Ottenhoff //*Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*.- 2008.- Mar.-8(1).-P.15-29.

303. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*/Pym, P.Brodin, R.Brosch [et.al] //Mol. Microbiol. -2002.- Vol.46.-P.709–717

304. Low-dose *Mycobacterium bovis* infection in cattle results in pathology indistinguishable from that of high-dose infection/ L. Johnson, G. Dean, S. Rhodes [et. al.] //Tuberculosis. -2007.-Vol. 87.-P. 71- 76.

305. Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculous lesions/ J.P. Cassidy, D.G. Bryson, G.M. Cancela [et.al.] //J.Comp. Pathol.- 2001.-Vol. -124.-P. 46-51.

306. McFadyean, J. Experiments with tuberculin on cattle/ J. McFadyean// BMJ.-1891.- N 1.- P. 634–635.

307. Measuring bovine  $\gamma\delta$  T cell function at the site of *Mycobacterium bovis* infection/ R.A. Rusk, M.V. Palmer, W.R. Water [et.al] // Veterinary Immunology and Immunopathology.-2017.-Vol.- 193–194.-P. 38-49

308. Modeling Tubercular ESX-1 Secretion Using *Mycobacterium marinum*/ A. E. Chirakos, A. Balaram, W. Conrad [et.al.] // Microbiol Mol Biol Rev.- 2020.- Vol.84(4).

309. Molecular and epidemiological population-based integrative analysis of human and animal *Mycobacterium bovis* infections in a low-prevalence setting/ Palacios J.J., Navarro Yu., Romero B. [et.al] // Veterinary Microbiology.- 2016.-V.195.- P.30-36

310. Myasoedov Y.M. The study of the sensitizing properties of mycobacteria of various species/ Y.M. Myasoedov // Journal of Agriculture and Environment.-2019. -N4 (12).-S.-25-27.

311. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage responses to IFN- $\gamma$  through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms/ S. M. Fortune, A. Solache, A. Jaeger [et.al.] // J. Immunol.- 2004. -Vol.172.-P.6272–6280.



312. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naïve CD4 T cells/ R. Blomgran, L. Desvignes, V. Briken [et.al.] // *Cell Host Microbe*.-2012. -Vol.11.-P.81–90.
313. *Mycobacterium tuberculosis*-Specific IL-21+IFN- $\gamma$ +CD4+ T Cells Are Regulated by IL-12/ L. Li, Y. Jiang, S. Lao [et.al] // *PLoSOne*.- 2016.- Jan 19. Vol. 11(1).-e0147356.
314. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN- $\gamma$  transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1/L. M. Ting, A. C. Kim, A. Cattamanchi [et.al] // *J. Immunol*. -1999.-Vol.163.-P.3898–3906.
315. *Mycobacterium riyadhense* sp. nov.; a non-tuberculous species identified as *Mycobacterium tuberculosis* by a commercial line-probe assay/J.V. Ingen, S. A. Al-Hajoj, B. Martin [et.al] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*.- 2009.-Vol. 59. P. 1049–1053.
316. Nagai, S. Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG/ S/ Nagai, J. Matsumoto, T. Nagasuga // *Infect Immun*.- 1981.- Vol.-31.-P. 1152-1160.
317. NK1.1+ Cells and IL-22 Regulate vaccine-induced protective immunity against challenge with *Mycobacterium tuberculosis*/ R. Dhiman, S. Periasamy, P.F. Barnes [et.al.] // *J. Immunol*.-2012.-Vol.189.-P.897– 905.
318. Nitric oxide production in the exhaled air of patients with pulmonary tuberculosis in relation to HIV co-infection/ J. Idh, A. Westman, E. Daniel [et. al.] // *BMC Infect Dis*.- 2008.- Vol. 24.- P.146-149.
319. OASs in Defense of Mycobacterial Infection: Angels or Demons? / W. Zhang, X. Cao, X. Chen [et. al.] // *Curr Issues Mol Biol*.- 2021.- V.40.-P.-221-230.
320. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Chapter 3.3.6.- Avian tuberculosis.- 2018.-P. 860-871.
321. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Chapter 2.4.6.-Bovine tuberculosis. -2018.- P. 1–17.
322. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Chapter 2.4.6. -Bovine tuberculosis. -2009.- P. 359-369.

323. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Chapter 2.4.7.- Bovine Tuberculosis. Production of tuberculin.- 2008.-P. 691–694.

324. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity/ C. Aagaard, M. Govaerts, V. Meikle [et.al] //J. Clin. Microbiol.- 2006.-Vol.44.-P. 4326–4335.

325. OrmeI, M. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis/ M. OrmeI., A. M. Cooper // Immunol Today.- 1999.- Jul;20 (7).- P.307-312.

326. Pathology of Naturally Occurring Bovine Tuberculosis in England and Wales E. Liebana, L. Johnson, J. Gough [et.al] // Veterinary Journal.- 2008.-Vol.176.- P. 354–360.

327. Palmer, M.V. Multinucleated giant cell cytokine expression in pulmonary granulomas of cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*/ M.V. Palmer, T.C. / Veterinary Immunology and Immunopathology.- 2016.- V.180.-P. 34-39.

328. Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection/ J.M. Pollock, J.D. Rodgers, M.D. Welsh [et.al] // Vet. Microbiol.- 2006.-Vol. 112.-P.141-150.

329. Potent inhibition of macrophage responses to IFN- $\gamma$  by live virulent *Mycobacterium tuberculosis* is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2/ N. Banaiee, E. Z. Kincaid, U. Buchwald [et.al.] //J. Immunol. - 2006. - Vol.176. - P.3019-3027.

330. Praud, A. Sensitivity of  $\gamma$ -interferon test used in series after tuberculin test to detect bovine tuberculosis/ A. Praud, C. Boireau, B. Dufour// Vet Rec.-2016.-Vol.7.- P.174-179.

331. Primary type II alveolar epithelial cells present microbial antigens to antigen-specific CD4<sup>+</sup> T-cells/ H. Debbabi, S. Ghost, A.B. Kamath [et.al.] // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. -2005.- Vol.289.-P. 274-279.

332. Production and partial characterization of monoclonal hybridoma antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*/C. Schou, Z.L. Juan, A.B. Andersen [et.al] // Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. – 1985. – Vol. 93. – P. 265-272.

333. Pyrah, I. T. Immunohistological study of the cutaneous delayed type hypersensitivity reaction in sheep / I. T. Pyrah, N. J. Watt// *Vet. Immunol Immunopathol.*- 1995.- V. 48(3-4).- P.299-312.

334. Quality controls and in vitro diagnostic efficiency of bovine PPD tuberculins / S. Tameni, M. Amadori, P. Scaccaglia [et.al] // *Biologicals.* – 1998. – Vol. 26. – № 3. – P. 225-235.

335. Quality control in the national bovine tuberculosis eradication programme in Ireland/ Duignan, M. Good, S.J. More// *Rev Sci Tech.*-2012.-Vol. 31. -P. 845–860.

336. Raising antibodies by coupling peptides to PPD and immunizing BCG-sensitized animals/ P.J. Lachmann, L. Strangeways, A. Vyakarnam [et. al.]// *Ciba Found Symp.*- 1986.-Vol. 119.-P. 25-57.

337. Rajashree, D. Differential migration of human monocyte-derived dendritic cells after infection with prevalent clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*/ D. Rajashree, P.Supriya, S.D. Das// *Jmmunobiol.* -2008.- Vol.213. -P.567-575.

338. Repeat tuberculin skin testing leads to desensitisation in naturally infected tuberculous cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses/ M. Coad, D. Clifford, S. G. Rhodes [et.al.] // *Veterinary research.* - 2010.- Vol. 41.- N. 2.- 14 p.

339. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis/ V. Ritacco, B. López, I.N. De Kantor [et.al] // *Res Vet Sci.* -1991.-V. 50.- P.365–367.

340. Rennie, B., Filion, L. G., Smart, N. Antibody response to a sterile filtered PPD tuberculin in *M. bovis* infected and *M. bovis* sensitized cattle/ B. Rennie, L. G. Filion, N. Smart// *BMC Veterinary Research.*-2010.- N 6.-P.- 50-64.

341. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy/ S. A.Robertson, A. S. Care, L. M. Moldenhauer [et.al] // *J. Clin. Invest.* - 2018.- N 1.- Vol. 128(10).-P.4224-4235.

342. Role of the dosR-dosS two-component regulatory system in *Mycobacterium tuberculosis* virulence in three animal models/ P. J. Converse, P. C. Karakousis, L. G. Klinkenberg [et.al.] // *Infect Immun.*- 2009.- Vol.77(3).- P. 1230-1237.

343. Saegerman C. Serological and cutaneous testing of bovine tuberculosis with the A60 antigen complex from *Mycobacterium bovis*, strain Calmette-Guerin / Saegerman C., Delville J., De Waele L., Gilsan D. // *Prevent. Vet. Med.* – 1995. – № 23. – P.239-248.

344. Savdra, J. Synthesis and biological assays of peptides from tuberculin-active protein / J. Savdra // *Infect. and Immun.* – 1983. – Vol. 40 – № 3. – P. 1163-1169.

345. Sauton, B. Sur la nutrition minerale du bacille tuberculeux / B. Sauton // *Rep.86 Inter. Congr. Appl. Chem.* – 1912. – № 19. – P. 267-269.

346. Sbarbaro, J.A. Tuberculin test. A re-emphasis on clinical judgment/ J.A. Sbarbaro // *Amer. Rev. resp. Dis.* – 1985. – Vol. 132. – P. 177-178.

347. Searching for proteins of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis with diagnostic potential by comparative qualitative proteomic analysis of mycobacterial tuberculins/ W. Santema, M. Overdijk, J. Barends [et.al.] // *Vet Microbiol.*- 2009.- Vol. 138. P.191-196.

348. Seibert, F.B. Tuberculin purified protein derivative: Preparation and analysis of a large quantity for standard / F.B. Seibert, J.T. Glen // *Amer. Rev. Tuberc.* – 1941. – Vol. 44. – P. 9-25.

349. Seibert, F.B. Purified protein derivative: its isolation from old tuberculin and fractionation of residue / F.B. Seibert, E. Du Four // *Amer. Rev. Tuberc.* - 1940. - Vol. 41. - P. 57-59.

350. Seibert, F.B. The isolation of three different proteins and two polysaccharides from tuberculin by alcohol fraction. Their chemical and biological properties / F.B. Seibert // *Amer. Rev. Tuberc.* – 1949. – № 59. – P. 86-101.

351. Seibert, F.B. Purified protein derivative / F.B. Seibert, J.D. Aronson, J. Reichel // *Amer. Rev. Tuberc.* – 1934. – Vol. 30. – P. 705-712.

352. Sequestration from immune CD4+ T cells of mycobacteria growing in human macrophages/ P. Pancholi, A. Mirza, N. Bhardwaj [et.al] // *Science.*- 1993.- Vol.260.-P. 984–986.

353. Schlesinger, L. S. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors/ L. S. Schlesinger// *J. Immunol.* -1993. -Vol.150. -P.2920–2930.

354. Schneider, W. Evaluation of tuberculins depending on the sensitization mode of the animals / W. Schneider, M. Schwanig // *Abstr. IABS Symposium BCG / Tuberculins.* – 1983. – № 2. – P. 80-84.

355. Shinnick, T. The *M. tuberculosis* 65 kDa antigen is heat shock protein which corresponds to common antigen and to the *E. coli* gro EL protein / T. Shinnick, M. Vodkin, J. Williams // *Infect. Immun.* – 1988. – Vol. 56. – P. 446-451.

356. Sheridan, M.P. IL-10 suppression of IFN- $\gamma$  responses in tuberculin-stimulated whole blood from *Mycobacterium bovis* infected cattle/ M.P. Sheridan, J.A. Browne, M.B. Doyle // *Veterinary Immunology and Immunopathology-2017.*-Vol.189.-P. 36-42.

357. Singh, S.D. Tuberculin-induced lymphocyte proliferation in whole blood: an antigen specific method for assessing immunosuppressive agents / S.D. Singh, C.G. Booth // *Immunol. Methods.* – 2002. – Vol. 1. – № 260. – P. 149-156.

358. Skinner, M.A. Cytotoxic T-cell responses to *Mycobacterium bovis* during experimental infection of cattle with bovine tuberculosis / M.A. Skinner, N. Parlane, A. McCarthy // *Immunology.* – 2003. – Vol. 110. – № 2. – P. 234-241.

359. Southey, A. Detection of *Mycobacterium bovis* infection and production of interleukin-2 by in vitro stimulation of badger lymphocytes / A. Southey, E. Costello, E. Gormley // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2002. – Vol.87. – № 1-2. – P. 73-78.

360. Sorensen, A.L. Purification and characterization of a low molecular mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis* / A.L. Sorensen, S. Nagai, G. Houen // *Infect. Immun.* – 1995. – Vol. 63. – P. 1710-1717.

361. Specificity of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 determined with mouse monoclonal antibodies/ T.M. Daniel, N. J. Gonchoroff, J.A. Katzmann [et.al.] // *Infect Immun.* - 1984.- Vol.45.- P.52-55.

362. Stanford, J.L. The nature and structure of species as applied to mycobacteria // J.L. Stanford, J.M. Grange // *Tubercle.* – 1974. – Vol. 53. – P. 143-152.

363. Stanford, J.L. An investigation of a range of new tuberculins. The effect of ageing, place of domicile BCG immunisation and tuberculosis / J.L. Stanford, M.J. Shield, G.A.W. Rook // *Bull. Int. Union Against Tuberculosis* – 1981. – Vol.56. – № 1-2. – P.28-34.

364. Stanford, J.L. The use of a sonicate preparation of *Mycobacterium tuberculosis* (New tuberculin) in the assessment of BCG vaccination / J.L. Stanford, E. Lema // *Tubercle.* – 1983. – Vol. 64. – № 4. – P. 275-282.

365. Stavri, D. *Mycobacterium tuberculosis* devoid of BCG-common antigens / D. Stavri, H. Stavri, J. Claicin // *Zbl. Bakt. Hyg. Abt. Orig.* – 1982. – Vol. 251. – P. 399-401.

366. Study of the association of interferon- $\gamma$  gene polymorphisms and Th1/Th2 balance in tuberculosis susceptibility/ Q. Wu, Y. Huang, Y. Zhou[et.al] // *Am J Transl.Res.*- 2021.-Vol.15.-P.5533-5539.

367. Suboptimal activation of antigen-specific CD4<sup>+</sup> effector cells enables persistence of *M. tuberculosis* in vivo/ T. D. Bold, N. Banaei, A. J. Wolf [et.al.] // *PLoS Pathog.*-2011. Vol. 7.- 1002063.

368. Tasaka, H. Specificity and distribution of Alpha antigen of *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum* and related species of *Mycobacteria* / H. Tasaka, T. Nomura, J. Matsuo // *Amer. Rev. Resp. Dis.* – 1985. – Vol. 132. – P. 173-174.

369. Takatsu, K. The immunogenic peptide for Th1 development / K. Takatsu, A. Kariyone // *Int. Immunopharmacol.* – 2003. – Vol. 3. – № 6. – P. 763-800.

370. Takeda, K. Toll-like receptors in innate immunity / K. Takeda, S. Akira // *Int. Immunol.* – 2005. – Vol. 17 – № 1. – P. 1-14.

371. Tenders. Request for Tenders Dated 17/05/2019 for the Supply of Liquid Bovine Tuberculin PPD, and Liquid Avian Tuberculin PPD. (2019). 146694&LID=162428 (accessed August 17, 2019).

372. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice/ T. Mogues, M. E. Goodrich, L. Ryan [et.al] // *J. Exp. Med.*- 2001.-Vol.193.-P. 271–280.

373. The comparative performance of the single intradermal comparative tuberculin test in Irish cattle, using tuberculin PPD combinations from different manufacturers/ M. Good, T. A. Clegg, F. Murphy [et.al.] // *Veterinary Microbiology*.- 2011.-Vol. 151.-P. 77–84.

374. The comparative performance of the single intradermal test and the single intradermal comparative tuberculin test in Irish cattle, using tuberculin PPD combinations of differing potencies/ M. Good, T. A. Clegg, E. Costello [et. al.] // *Veterinary Journal*. 2011.- Vol.190.- P.60–65.

375. Thole, J.E. Cloning of *Mycobacterium bovis* BCG DNA and expression of antigens in *Escherichia coli*/ J.E. Thole, H.G. Dauwerse, P.K. Das // *Infect. and Immun.* – 1985. – Vol. 50. – P. 800-806.

376. Three protein cocktails mediate delayed-type hypersensitivity responses indistinguishable from that elicited by purified protein derivative in the guinea pig model of *Mycobacterium tuberculosis* infection/H. Yang, J. L. Troudt , A. Grover [et. al.] // *Infect Immun.*- 2011.-Vol. 79(2).- P. 716-723.

377. The immunology of tuberculosis: from bench to bedside/ K. Dheda, S.K. Schnander, B. Zhu [et.al.] // *Respirology*. -2010.- Vol.15(3).- P.433-450.

378. The history of in vivo tuberculin testing in bovines: tuberculosis, a “One Health” issue/ M. Good, D. Bakker, A. Duignan [et.al.] // *Front Vet Sci*. -2018.- Vol. 5.- P.1-16.

379. Thacker TC, Palmer MV, Waters WR (2007) Associations between cytokine gene expression and pathology in *Mycobacterium bovis* infected cattle/ T.C. Thacker, M.V. Palmer, W.R. Waters // *Veterinary Immunology and Immunopathology*.- 2007.-Vol. 119.-P. 204-213.

380. Tizard, I.R. *Veterinary Immunology An Introduction*/ I.R. Tizard.- New York : Elsevier, 2004. – 512 p.- ISBN 978-1-4557-0362-3

381. Time dependent expression of cytokines in *Mycobacterium bovis* infected cattle lymph nodes/ J. Witchell, S. Maddipatla, A. Wangoo [et.al] // *Veterinary Immunology and Immunopathology*.-2010.-Vol. 138.-P.79–84.

382. Tindel, J. Some observations and discussion on the tuberculin test in Europe and USA/ J. Tindel//*Veter. J.*- 1961.-v9.-№4.-P.69-79.

383. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* /E. H. Noss, R. K. Pai, T. J. Sellati [et.al] // *J. Immunol.*- 2001.-Vol. 167.- P. 910–918.

384. Transcriptional programming and gene regulation in WC1+  $\gamma\delta$  T cell subpopulations/ P. Damani-Yokota, F. Zhang, A. Gillespie [et.al.] // *Mol Immunol.*- 2022.- Vol.142.- P. 50-62.

385. Tsukaguchi, K. CD4+ alpha beta T cell and gamma delta T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*. Similarities and Differences in Ag recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production/ K. Tsukaguchi, K.N. Balaji, W.H. Boom // *Immunol.* – 1995. – Vol. 154. – P. 1786-1796.

386. Tuberculosis Treatment Response Monitoring by the Phenotypic Characterization of MTB-Specific CD4+ T-Cells in Relation to HIV Infection Status/ N. Siteo, M.I. Ahmed, M. Enosse [et.al] // *Pathogens.*- 2022.- N12;11(9).-P.1034-1040.

387. Tuberculin purified protein derivative. Tuberculin PPD. British Pharmacopoeia. Volume II. London, United Kingdom: British Pharmacopoeia Commission Office.- 2003.-P.2836-2838.

388. Tuberculini derivatum protein sumpurificatum adusum humanum. Tuberculin purified protein derivative for human use. European Pharmacopoeia. Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM). Strasbourg, Cedex, France.- 2002.-P.2089-2091.

389. Tuberculin PPD Potency Assays in Naturally Infected Tuberculous Cattle as a Quality Control Measure in the Irish Bovine Tuberculosis Eradication Programme/ Duignan, K. Kenne, D. Bakker [et.al.] // *Frontiers in Veterinary Science.*- October 2019.-Volume 6.-P. 1-12.

390. Turcotte, R. Influence of the age of mycobacterial cultures on the protein and carbohydrate composition on tuberculosis/ R. Turcotte, J. Des Ormeaux // *Can. J. Microbiol.* – 1972. – Vol. 18. – P. 637-645.



391. Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection/ C. B. Ford, P.L. Lin, M.R. Chase [et.al.] // *Nature Genet.*-2011.-Vol. 43.- P.482–486.

392. Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle/ B.M. Buddle, A.R. McCarthy, T.J. Ryan [et.al.] // *Vet. Rec.*- 2003.-Vol.-153.- P. 615–620.

393. Varela, E. Isolation of a 19-kDa mycobacterium, bovis-specific antigen, different from MPB70/80, by chromatofocusing/ E. Varela, F. Masso, A. Paez // *Prep. Biochem. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 32. – № 4. – P. 329-340.

394. Villarino, M.E. Comparison testing of current (PPD-S1) and proposed (PPD-S2) reference tuberculin standards/ M.E. Villarino, M.J. Brennan, C.M. Nolan // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* – 2000 – Vol. 4. – P. 1167-1171.

395. Walker D. Economic analysis of tuberculosis diagnostic tests in disease control: how can it be modeled and what additional information is needed? / D. Walker// *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* – 2001. – Vol. 5. – № 12. – P. 1099-1108.

396. Waters, W.R. Expression of L-Selectin (CD62L), CD44 and CD25 on activated bovine T cells/ W.R. Waters, T.E. Rahner, M.V. Palmer // *Infect. Immun.* 2003.- Vol. 71.- № 1. – P. 317-326.

397. Waters, W.R. Diagnostic implications of antigen-induced gamma interferon, nitric oxide, and tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle/ W.R. Waters, M.V. Palmer, D.L. Whipple // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003. Vol. 10.- № 5. – P. 960-966.

398. Watson, E. Studies of biological fixation by tuberculin – a new method of standardization/ E. Watson, L. Heath // *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* -1924. -Vol. 66. -P. 24-27.

399. Weise, D.W. Studies on the Heterologous immunogenicity of a methanol-insoluble fraction of attenuated tubercle bacilli (BCG)/ D.W. Weise, R.S. Bonhag, J.A. Parks // *Exp. Med.* -1964.- Vol. 53.- P. 119-121.

400. WHO International Standard Purified Protein Derivative (PPD) of *Mycobacterium bovis* Tuberculin NIBSC code: PPDBOV Instructions for use (Version 6.0, Dated 14/10/2010)

401. WHO International Standard Purified Protein Derivative (PPD) of *Mycobacterium avium* Tuberculin NIBSC code: PPDA Instructions for use (Version 5.0, Dated 19/10/2007)

402. Wijsmuller, G. The problem of comparing tuberculins for potency/ G. Wijsmuller // Bull. WHO.- 1971.- Vol. 45.- P. 633-648.

403. Wijsmuller, G. A method of characterizing tuberculins/ G. Wijsmuller, A.L. Bardine // Amer. Rev. Resp. Dis. -1972. -Vol. 105. -P. 736-746.

404. Wilson, M. Bacterial perturbation of cytokine networks/ M. Wilson, R. Seymour, B. Henderson // Infect. Immun.- 1998.- Vol. 66.- P. 2401-2409.

405. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors/ O. E. Sørensen, J. B. Cowland, K. Theilgaard-Mönch [et.al] // J Immunol.- 2003.-N 1.-Vol. 170 (11). P. 5583-5589.

406. Worsaae A, Ljungqvist L, Heron I. Monoclonal antibodies produced in BALB.B10 mice define new antigenic determinants in culture filtrate preparations of *Mycobacterium tuberculosis*/ A. Worsaae, L. Ljungqvist, I.Heron// J Clin Microbiol.- 1988.- Vol. 26.-P.2608-2614.

407. Wood, P.R. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of  $\gamma$ -interferon/ P.R. Wood, L.A. Corner, P. Plackett // Res. Vet. Set.- 1990.- Vol. 49.- P. 46-49.

408. Yamaguchi, R. Cloning and characterization of gene for immunogenic protein MPB64 of *M. bovis* BCG/ R. Yamaguchi, K. Matsuo, A. Yamazaki // Infect. Immun.- 1989.- Vol. 57.- P. 283-288.

409. Yu, Ma. Immunochemical analysis of tuberculin purified protein derivative with special reference to United States – Japan Antigen 7 / Yu Ma, Daniel T.M. // J. Infect. Dis. – 1983. – Vol. 148. – № 3. – P. 500-509.

410. Zeitschr, F. Der praktische Wert der Tuberkulin-Augenprobe bei Rindern. Original in German (the practical value of tuberculin test in cattle eyes). Zeitschrift für Tiermedizin.-1908.- XII Bd. XV. S.321–347.

411. Zsidai J. Comparative testing of the potency of different PPD preparations / Zsidai J., Joo I. // Dev. Biol. Stand. – 1986. – Vol. 58. – P. 599-605.

## 12. ПРИЛОЖЕНИЯ

К диссертационной работе прилагаются следующие копии документов:

№	Наименование документа	Стр.
1.	Профилактические, диагностические, ограничительные и иные мероприятия, установление и отмена карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов туберкулёза животных (методические рекомендации)	249
2.	Профилактические, диагностические, лечебные, ограничительные и иные мероприятия, установление и отмена карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию паратуберкулёза животных (методические рекомендации)	251
3.	Применение симультанной пробы с ППД-туберкулином для млекопитающих комплексным аллергеном из атипичных микобактерий (КАМ) для индивидуального учёта аллергических реакций, отбора реагирующих животных для диагностического убоя и установления диагноза на туберкулёз (методические рекомендации)	253
4.	Туберкулины очищенные (ППД) для животных ГОСТ 32306-2013	255
5.	Шприц для введения животным суспензий лекарственных препаратов и антигенных субстанций. Патент №110994	257
6.	Пробка для укупорки стеклянных контейнеров, используемых в микробиологии. Патент №116472	259
7.	Способ моделирования гиперчувствительности замедленного типа у морских свинок на микобактерии <i>M. bovis</i> . Патент № 2517218	261
8.	Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2013617658	263
9.	Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2014611927	264
10.	Устройство определения морфологических количественных параметров воспалительного процесса, протекающего в коже лабораторных животных. Патент № 140669	265
11.	Способ выявления анергичного, больного туберкулезом крупного рогатого скота. Патент № 2657837	267
12.	Способ оценки сенсibilизирующих свойств микобактерий и микобактериальных антигенов. Патент № 2691398	268
13.	Способ оценки сенсibilизирующих свойств атипичных микобактерий. Патент № 2715220	270
14.	Комплексный аллерген для диагностики паратуберкулёза. Патент № 2771778	272
15.	Способ дифференциации <i>M. avium subsp. paratuberculosis</i> от других видов микобактерий на сенсibilизированных этими видами микобактерий морских свинках. Патент № 2800320	273
16.	Диплом (Золотая осень 2018 г.): «За разработку нового метода аллергической диагностики туберкулёза крупного рогатого скота»	274
17.	Диплом (Золотая осень 2020 г.): «За разработку методических рекомендаций: «Применение симультанной пробы с ППД туберкулином для млекопитающих и комплексным аллергеном из атипичных микобактерий (КАМ) для индивидуального учёта аллергических реакций, отбора реагирующих животных для диагностического убоя и установления диагноза на туберкулёз»	275
18.	Диплом (Золотая осень 2022 г.): «За разработку комплексного аллергена для диагностики паратуберкулёза»	276
19.	Диплом (Золотая осень 2022 г.): «За серию монографий: «Бруцеллёз», «Туберкулёз», «Паратуберкулёз»	277

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР – ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ  
ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»  
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

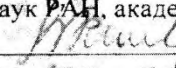
УТВЕРЖДАЮ

Руководитель секции

«Зоотехния и ветеринария»

Отделения сельскохозяйственных

наук РАН, академик РАН

 В. В. Калашников

« 20 » декабря 2019 г.

**Профилактические, диагностические, ограничительные  
и иные мероприятия, установление и отмена карантина  
и иных ограничений, направленных на предотвращение  
распространения и ликвидацию очагов  
туберкулёза животных**

Методические рекомендации

Москва 2019

УДК

ББК

DOI

Материалы рассмотрены и одобрены на заседании Научно-методической комиссии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол № 1 от 29 января 2019 г.), рассмотрены и утверждены к печати на заседании Учёного совета ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол № 2 от 31 января 2019 г.), утверждены Руководителем секции «Зоотехния и ветеринария» Отделения сельскохозяйственных наук РАН, академиком РАН Калашниковым В.В. 28 февраля 2019 г.

Рецензенты:

*Букова Н.К.* - доктор биологических наук, профессор, учёный секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»;

*Ленченко Е.М.* - доктор ветеринарных наук, профессор, профессор кафедры Ветеринарная медицина Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств».

Профилактические, диагностические, ограничительные и иные мероприятия, установление и отмена карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов туберкулёза: методические рекомендации / Найманов А.Х., Гулюкин А.М., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Калмыков В.М., Исаев Ю.Г. (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), Донченко А.С., Донченко Н.А. (ФГБНУ ИЭВСидВ), Безгин В.М., Козлов В.Е., Мясоедов Ю.М. (ФГУП Курская биофабрика), Муковнин А.А. (Департамент ветеринарии) – Москва 2019. – 26 с.

Методические рекомендации подготовлены в рамках выполнения Государственного задания ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН на 2019-21 гг.

Методические рекомендации разработаны с целью обеспечения нормативной базы для установления единых норм и требований при осуществлении профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, направленных на предотвращение распространения и ликвидации очагов туберкулёза на территории Российской Федерации.

© ФГБОУ ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, 2019

© Авторский коллектив, 2019

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР – ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ  
ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»  
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель секции

«Зоотехния и ветеринария»

Отделения сельскохозяйственных

наук РАН, академик РАН

 В. В. Калашников

« 21 »  2019 г.

**Профилактические, диагностические, лечебные,  
ограничительные и иные мероприятия, установление и  
отмена карантина и иных ограничений, направленных  
на предотвращение распространения и ликвидацию  
паратуберкулёза животных**

Методические рекомендации

Москва 2019

УДК

ББК

DOI

Материалы рассмотрены и одобрены на заседании Научно-методической комиссии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол № 1 от 29 января 2019 г.), рассмотрены и утверждены к печати на заседании Учёного совета ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол № 2 от 31 января 2019 г.), утверждены Руководителем секции «Зоотехния и ветеринария» Отделения сельскохозяйственных наук РАН, академиком РАН Калашниковым В.В. 28 февраля 2019 г.

Рецензенты:

*Букова Н.К.* - доктор биологических наук, профессор, учёный секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»;

*Ленченко Е.М.* - доктор ветеринарных наук, профессор, профессор кафедры Ветеринарная медицина Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств».

Профилактические, диагностические, лечебные, ограничительные и иные мероприятия, установление и отмена карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию паратуберкулёза животных: методические рекомендации / Найманов А.Х., Гулюкин А.М., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Калмыков В.М., Исаев Ю.Г. (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), Донченко А.С., Донченко Н.А. (ФГБНУ ИЭВСиДВ), Безгин В.М., Козлов В.Е., Мясоедов Ю.М. (ФГУП Курская биофабрика), Муковнин А.А. (Департамент ветеринарии) – Москва 2019. – 26 с.

Методические рекомендации подготовлены в рамках выполнения Государственного задания ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН на 2019-21 гг.

Методические рекомендации разработаны с целью обеспечения нормативной базы для установления единых норм и требований при осуществлении профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, направленных на предотвращение распространения и ликвидации очагов паратуберкулёза на территории Российской Федерации.

© ФГБОУ ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, 2019

© Авторский коллектив, 2019



Российская академия наук  
Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный научный центр – Всероссийский научно-  
исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени  
К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель секции

«Зоотехния и ветеринария»

Отделения сельскохозяйственных

наук ВАН, академик РАН

 В.В. Калашников

«10» ноября 2020 г.

**Применение симультанной пробы с ППД-туберкулином для  
млекопитающих и комплексным аллергеном из атипичных  
микобактерий (КАМ) для индивидуального учёта  
аллергических реакций, отбора реагирующих животных для  
диагностического уоя и установления диагноза на туберкулёз**

Методические рекомендации

Москва - 2020

Материалы рассмотрены и одобрены на заседании Научно-методической комиссии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол № 3 от 16.06.2020 г.), рассмотрены и утверждены к печати на заседании Ученого совета ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол № 3 от 18.06.2020 г.), утверждены Руководителем секции «Зоотехния и ветеринария» Отделения сельскохозяйственных наук РАН, академиком РАН Калашниковым В.В. «10» 11 2020 г.)

Рецензенты:

*Букова Н.К.* – доктор биологических наук, профессор, ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»;

*Ленченко Е.М.* – доктор ветеринарных наук, профессор, профессор кафедры Ветеринарная медицина Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств».

Применение симультанной пробы с ППД-туберкулином для млекопитающих и комплексным аллергеном из атипичных микобактерий (КАМ) для индивидуального учёта аллергических реакций, отбора реагирующих животных для диагностического убоя и установления диагноза на туберкулез: методические рекомендации / Найманов А.Х., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Устинова Г.И., Кучерук О.Д., Исаев Ю.Г., Степанова Т.В. (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), Безгин В.М., Мясоедов Ю.М. (Курская биофабрика) Муковнин А.А. (Департамент ветеринарии) – Москва, 2020. - 7 с.

Методические рекомендации подготовлены в рамках выполнения Государственного задания ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН на 2019-2021 гг.

ФГБОУ ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, 2020

Авторский коллектив, 2020

---

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ  
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION  
(ISC)

---

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
СТАНДАРТ

ГОСТ  
32306—  
2013

---

**ТУБЕРКУЛИНЫ ОЧИЩЕННЫЕ (ППД)  
ДЛЯ ЖИВОТНЫХ**

**Технические условия**

Издание официальное



Москва  
Стандартинформ  
2014



ГОСТ (проект RU, окончательная редакция)

УДК 619: 615 (074)

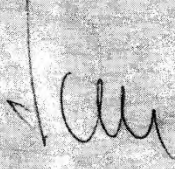
МКС 11.220

65.020.30


**Ключевые слова:** туберкулин очищенный (ППД) для млекопитающих, туберкулин очищенный (ППД) для птиц, стандартный раствор, лиофилизация, диагностика, туберкулез, стерильность, реактогенность, сенсibiliзирующие свойства, активность, специфичность

**Руководители организаций разработчиков:**

Директор ФГБУ «ВГНКИ»


 А.Н. Панин

Генеральный директор  
ФГУП «Курская биофабрика»

 В.М. Безгин

**Руководитель разработки:**

Заместитель генерального директора  
по науке ФГУП «Курская биофабрика»

 В.Е. Козлов

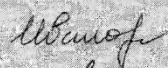
**Исполнители:**

**От ФГУП «Курская биофабрика»:**


Заместитель генерального директора  
по производству

 Е.Н. Солодов

Начальник лаборатории туберкулеза  
и туберкулинодиагностики


 Н.В. Иванова

Начальник ОБТК


 Ю.М. Мясоедов

**От ФГБУ «ВГНКИ»:**


Зав. отделом бактериальных лекарственных  
средств для ветеринарного применения

 О.Д. Складов

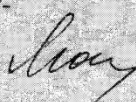
Зав. лабораторией качества и стандартизации  
бактериальных лекарственных средств для  
ветеринарного применения

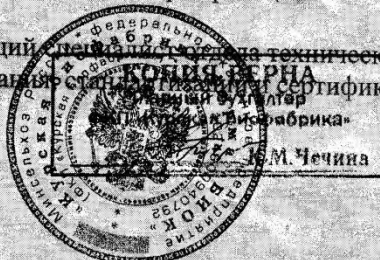
 Н.К. Букова

Начальник отдела технического регулирования,  
стандартизации и сертификации

 Т.Н. Сергеева

Ведущий специалист отдела технического регу-  
лирования и стандартизации и сертификации

 Т.Н. Мохина



## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ

№ 110994

**ШПРИЦ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ ЖИВОТНЫМ СУСПЕНЗИЙ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И АНТИГЕННЫХ  
СУБСТАНЦИЙ**

Патентообладатель(и): *Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Курская государственная сельскохозяйственная академия имени профессора И.И. Иванова" Министерства сельского хозяйства Российской Федерации (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2011118147

Приоритет полезной модели 05 мая 2011 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре полезных моделей Российской Федерации 10 декабря 2011 г.

Срок действия патента истекает 05 мая 2021 г.

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **110 994** (13) **U1**

(51) МПК  
A61M 5/315 (2006.01)  
A61M 5/31 (2006.01)

**(12) ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2011118147/14, 05.05.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
05.05.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 05.05.2011

(45) Опубликовано: 10.12.2011 Бюл. № 34

Адрес для переписки:

305021, г.Курск, ул. К. Маркса, 70, Курская  
ГСХА, патентный отдел

(72) Автор(ы):

Мясоедов Юрий Михайлович (RU),  
Морозов Сергей Владимирович (RU)

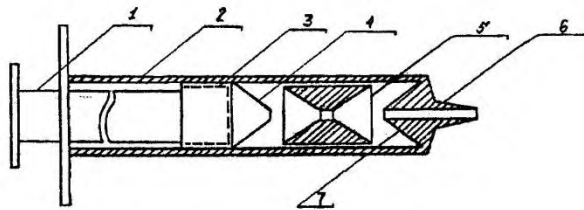
(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное  
образовательное учреждение высшего  
профессионального образования "Курская  
государственная сельскохозяйственная  
академия имени профессора И.И. Иванова"  
Министерства сельского хозяйства  
Российской Федерации (RU)(54) ШПРИЦ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ ЖИВОТНЫМ СУСПЕНЗИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ  
И АНТИГЕННЫХ СУБСТАНЦИЙ

(57) Формула полезной модели

1. Шприц для введения животным суспензий лекарственных препаратов и антигенных субстанций, включающий цилиндрический корпус с канюлей для иглы, поршень со штоком, отличающийся тем, что в корпус помещена втулка с двумя воронкообразными выемками на торцах, обращенными друг к другу минимальными диаметрами и соединенными цилиндрическим переходом, а на поршне имеется резиновый уплотнитель, торцевая часть которого выполнена в виде конуса, поверхность которого совпадает с воронкообразной поверхностью втулки, при этом внутренняя торцевая часть корпуса выполнена в виде воронкообразного выступа, совпадающего с воронкообразной выемкой втулки.

2. Шприц по п.1, отличающийся тем, что втулка выполнена из химически стойкого материала.





## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ

№ 116472

**ПРОБКА ДЛЯ УКУПОРКИ СТЕКЛЯННЫХ  
 КОНТЕЙНЕРОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В  
 МИКРОБИОЛОГИИ**

Патентообладатель(и): *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Курская государственная сельскохозяйственная академия имени профессора И.И. Иванова Министерства сельского хозяйства Российской Федерации (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2012100095

Приоритет полезной модели 10 января 2012 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре полезных моделей Российской Федерации 27 мая 2012 г.

Срок действия патента истекает 10 января 2022 г.

*Руководитель Федеральной службы  
 по интеллектуальной собственности*

*Б.П. Симонов*

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **116 472** <sup>(13)</sup> **U1**(51) МПК  
B65D 39/00 (2006.01)**(12) ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2012100095/12, 10.01.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
10.01.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 10.01.2012

(45) Опубликовано: 27.05.2012 Бюл. № 15

Адрес для переписки:

305021, г.Курск, ул. К. Маркса, 70, КГСХА

(72) Автор(ы):

Мясоедов Юрий Михайлович (RU),  
Морозов Сергей Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
профессионального образования Курская  
государственная сельскохозяйственная  
академия имени профессора И.И. Иванова  
Министерства сельского хозяйства  
Российской Федерации (RU)**(54) ПРОБКА ДЛЯ УКУПОРКИ СТЕКЛЯННЫХ КОНТЕЙНЕРОВ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ В МИКРОБИОЛОГИИ****(57) Формула полезной модели**

1. Пробка для укупорки стеклянных контейнеров, используемых в микробиологии, включающая винт-регулятор, состоящий из ручки в форме диска, с нанесенными на нем двумя рисками, и штока с нарезанной на нем в верхней части резьбой, диаметр которой больше диаметра штока, и в которой выполнена поперечная проточка, полый корпус в виде катушки, имеющей верхний ограничитель в виде цилиндра, внутри которого нарезана резьба, а снаружи нанесена риска, нижний ограничитель в виде диска и перешеек в форме усеченного конуса между ограничителями, на котором надет силиконовый уплотнитель, причем нижняя торцевая часть штока выполнена в виде выемки, имеющей форму усеченного конуса, а внутри нижней торцевой части корпуса выполнен выступ в форме усеченного конуса, совпадающий по форме с выемкой на штоке винта-регулятора и имеющий сквозное цилиндрическое отверстие, выполненное вдоль оси конуса.

2. Пробка по п.1, отличающаяся тем, что силиконовый уплотнитель выполнен в виде кольца, внутренний диаметр которого на 1 мм меньше внешнего диаметра перешейка корпуса.

3. Пробка по п.1, отличающаяся тем, что корпус пробки и винт-регулятор выполнены из фторопласта.

RU 1 1 6 4 7 2 U 1

RU 1 1 6 4 7 2 U 1



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2517218

**СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ  
ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА У  
МОРСКИХ СВИНОК НА МИКОБАКТЕРИИ M. BOVIS**

Патентообладатель(и): *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Курская государственная сельскохозяйственная академия имени профессора И.И. Иванова Министерства сельского хозяйства Российской Федерации (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2012145515

Приоритет изобретения 25 октября 2012 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 28 марта 2014 г.

Срок действия патента истекает 25 октября 2032 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

Б.П. Симонов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 517 218** <sup>(13)</sup> **C1**

(51) МПК  
A61K 39/04 (2006.01)  
A61P 37/02 (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012145515/15, 25.10.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
25.10.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.10.2012

(45) Опубликовано: 27.05.2014 Бюл. № 15

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: US 7579003 B2, 25.08.2009. BOVINE  
TUBERCULOSIS. Chapter 2.4.7. OIE  
Terrestrial Manual. May 2009, pp.1-16  
[Найдено 11.12.2013] [он-лайн], Найдено из  
Интернет [http://www.oie.int/fileadmin/Home/  
eng/Health\\_standards/tahm/  
2.04.07\\_BOVINE\\_TB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf). RU 2277540 C2,  
10.06.2006. RU 2337707 C2, 10.11.2008

Адрес для переписки:

305021, г.Курск, ул. К. Маркса, 70, КГСХА

(72) Автор(ы):

Мясоедов Юрий Михайлович (RU),  
Морозов Сергей Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
профессионального образования Курская  
государственная сельскохозяйственная  
академия имени профессора И.И. Иванова  
Министерства сельского хозяйства  
Российской Федерации (RU)

(54) СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА У  
МОРСКИХ СВИНОК НА МИКОБАКТЕРИИ M. BOVIS

(57) Реферат:

Изобретение относится к области  
аллергологии и иммунологии и предназначено  
для оценки влияния иммунобиологических  
препаратов на кожную реакцию  
гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).  
Предложен способ моделирования ГЗТ у морских  
свинок на микобактерии M. bovis. Осуществляют  
внутрикожное введение альбиносам самкам  
морских свинок, полученных близкородственным

скрещиванием брат х сестра (F<sub>2</sub>), авирулентных  
микобактерий M. bovis штамм BCG с  
последующим формированием групп(-ы)  
животных по размеру воспалительной реакции в  
ответ на внутрикожное введение микобактерий  
M. bovis штамм BCG через 30-35 дней.  
Предлагаемый способ эффективен в изучении  
механизмов развития ГЗТ и оценке  
противотуберкулезных препаратов. 2 табл., 5 пр.

C 1  
2 5 1 7 2 1 8  
R U

R U  
2 5 1 7 2 1 8  
C 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации программы для ЭВМ

№ 2013617658

Bioactive 1.0

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Курская государственная сельскохозяйственная академия имени профессора И.И.Иванова" (RU)*

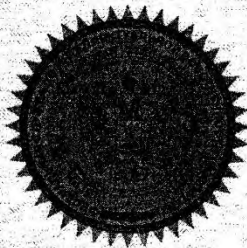
Авторы: *Мясоедов Юрий Михайлович (RU), Быков Владимир Станиславович (RU), Морозов Сергей Владимирович (RU)*

Заявка № 2013614293

Дата поступления 20 мая 2013 г.

Дата государственной регистрации  
в Реестре программ для ЭВМ 21 августа 2013 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

  
Б.П. Симонов

## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации программы для ЭВМ

№ 2014611927

Specificity 1.0

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Курская государственная сельскохозяйственная академия имени профессора И.И.Иванова (RU)*

Авторы: *Мясоедов Юрий Михайлович (RU), Шейн Владимир Владимирович (RU), Морозов Сергей Владимирович (RU)*

Заявка № 2013662298

Дата поступления 26 декабря 2013 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре программ для ЭВМ 13 февраля 2014 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ

№ 140669

**УСТРОЙСТВО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ  
КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ  
ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА, ПРОТЕКАЮЩЕГО В  
КОЖЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Курская государственная сельскохозяйственная академия имени профессора И.И. Иванова Министерства сельского хозяйства Российской Федерации (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2014100617

Приоритет полезной модели 09 января 2014 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре полезных моделей Российской Федерации 14 апреля 2014 г.

Срок действия патента истекает 09 января 2024 г.

*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

*Б.П. Симонов*

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **140 669** <sup>(13)</sup> **U1**  
 (51) МПК  
 А61В 600 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

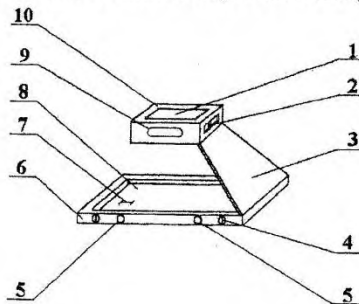
## (12) ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ ОПИСАНИЯ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014100617/14, 09.01.2014	(72) Автор(ы): Мясоедов Юрий Михайлович (RU), Морозов Сергей Владимирович (RU)
(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 09.01.2014	(73) Патентообладатель(и): Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Курская государственная сельскохозяйственная академия имени профессора И.И. Иванова Министерства сельского хозяйства Российской Федерации (RU)
Приоритет(ы): (22) Дата подачи заявки: 09.01.2014	
(45) Опубликовано: 20.05.2014 Бюл. № 14	
Адрес для переписки: 305021, г. Курск, ул. К. Маркса, 70, КГСХА, патентный отдел, Жуковой В.Т.	

(54) УСТРОЙСТВО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА, ПРОТЕКАЮЩЕГО В КОЖЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

## (57) Формула полезной модели

Устройство определения морфологических количественных параметров воспалительного процесса, протекающего в коже лабораторных животных, характеризующееся тем, что корпус с вмонтированной цифровой камерой неподвижно закреплен на кронштейне, который неподвижно соединен с основанием, в последнем выполнено отверстие в виде окна со стеклом, на поверхности которого нанесена масштабная линия, в верхней части корпуса закреплен жидкокристаллический дисплей, а в нижней части корпуса установлены светоизлучающие диоды, на боковой поверхности корпуса расположены кнопка управления цифрового захвата и переключатель управления работой светоизлучающих диодов, причем на основании закреплен светозащитный кожух, внутренняя часть которого имеет покрытие чёрного цвета.





## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2657837

**Способ выявления анергичного, больного туберкулёзом  
крупного рогатого скота**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение Всероссийский научно-  
исследовательский институт экспериментальной  
ветеринарии имени Я.П. Коваленко (RU)*

Авторы: *Найманов Али Хусинович (RU), Муковнин Андрей  
Александрович (RU), Мясоедов Юрий Михайлович (RU)*

Заявка № 2017133978

Приоритет изобретения 29 сентября 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

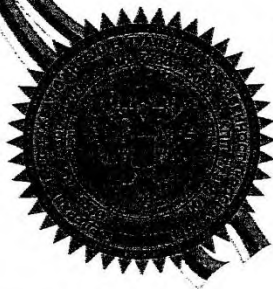
Российской Федерации 15 июня 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 29 сентября 2037 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

*Г.П. Ивлиев* Г.П. Ивлиев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2691398

**Способ оценки сенсibiliзирующих свойств микобактерий  
и микобактериальных антигенов**Патентообладатель: **Мясоедов Юрий Михайлович (RU)**Автор: **Мясоедов Юрий Михайлович (RU)**Заявка № **2018129004**Приоритет изобретения **07 августа 2018 г.**

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **13 июня 2019 г.**

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает **07 августа 2038 г.**Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 691 398** <sup>(13)</sup> **C1**(51) МПК  
G01N 33/569 (2006.01)ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

На основании пункта 1 статьи 1366 части четвертой Гражданского кодекса Российской Федерации патентообладатель обязуется заключить договор об отчуждении патента на условиях, соответствующих установившейся практике, с любым гражданином Российской Федерации или российским юридическим лицом, кто первым изъявил такое желание и уведомил об этом патентообладателя и федеральный орган исполнительной власти по интеллектуальной собственности.

(52) СПК  
G01N 33/569 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2018129004, 07.08.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
07.08.2018Дата регистрации:  
13.06.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.08.2018

(45) Опубликовано: 13.06.2019 Бюл. № 17

Адрес для переписки:

305010, Курская обл., г. Курск, п. Юбилейный,  
ул. Курская, 32, Мясоедов Юрий Михайлович

(72) Автор(ы):

Мясоедов Юрий Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Мясоедов Юрий Михайлович (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2517218 C1, 27.05.2014. МЯСОЕДОВ Ю. М. Изучение параметров крови морских свинок, сенсibilизированных инактивированными микобактериями *M. bovis*, при моделировании туберкулезной инфекции // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии, 2017, N 7. ГОСТ 26072-89 Животные и птица сельскохозяйственные методы лабораторной диагностики (см. прод.)

(54) Способ оценки сенсibilизирующих свойств микобактерий и микобактериальных антигенов

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к иммунологии, и может быть использовано для оценки сенсibilизирующих свойств микобактерий и микобактериальных антигенов. Для этого вводят в организм морских свинок-альбиносов или морских свинок с белыми боками материал, содержащий микобактерии или микобактериальные антигены. Последующее определение аллергической реактивности морских свинок, через 30-35 суток, осуществляется по проявлению и интенсивности кожной реакции

ПЧЗТ через 24 часа после внутрикожного введения в правую боковую поверхность двух доз ППД для млекопитающих, содержащих 2,5 нг белка и 0,1 нг белка, а в левую боковую поверхность двух доз ППД для птиц, содержащих 2,5 нг белка и 0,1 нг белка. Изобретение обеспечивает повышение информативности и точности способа оценки сенсibilизирующих свойств микобактерий и микобактериальных антигенов. 5 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

туберкулеза, М.: Изд-во стандартов, 1989. US 7579003 B2, 25.08.2009. KZ 20951 A4, 16.03.2009. HAGA S. et al. Delayed-type hypersensitivity to a recombinant mycobacterial antigen, МРВ64, in guinea pigs

RU 2 691 398 C 1

RU 2 691 398 C 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2715220

**Способ оценки сенсibiliзирующих свойств атипичных  
микобактерий**Патентообладатель: *Мясоедов Юрий Михайлович (RU)*Автор: *Мясоедов Юрий Михайлович (RU)*

Заявка № 2019136596

Приоритет изобретения 13 ноября 2019 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 26 февраля 2020 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 13 ноября 2039 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(19) **RU** (11) **2 715 220** <sup>(13)</sup> **C1**(51) МПК  
*G01N 33/569* (2006.01)**(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На основании пункта 1 статьи 1366 части четвертой Гражданского кодекса Российской Федерации патентообладатель обязуется заключить договор об отчуждении патента на условиях, соответствующих установившейся практике, с любым гражданином Российской Федерации или российским юридическим лицом, кто первым изъявил такое желание и уведомил об этом патентообладателя и федеральный орган исполнительной власти по интеллектуальной собственности.

(52) СПК  
*G01N 33/569 (2020.01)*

(21)(22) Заявка: 2019136596, 13.11.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
13.11.2019Дата регистрации:  
26.02.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.11.2019

(45) Опубликовано: 26.02.2020 Бюл. № 6

Адрес для переписки:

305010, Курская обл., г. Курск, п. Юбилейный,  
ул. Курская, 32, Мясоедов Юрий Михайлович

(72) Автор(ы):

Мясоедов Юрий Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Мясоедов Юрий Михайлович (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2687553 C1, 15.05.2019. US 9717782 B2, 01.08.2017. МЯСОЕДОВ Ю.М., Модифицированная симультанная аллергическая проба на крупном рогатом скоте при диагностике микобактериальных инфекций, Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии, 2018, N5, С.120 - 125. Найдено из Интернета [он-лайн] на сайте: (см. прод.)

(54) Способ оценки сенсibiliзирующих свойств атипичных микобактерий

## (57) Формула изобретения

Способ оценки сенсibiliзирующих свойств атипичных микобактерий, включающий подкожное введение 2-3 морским свинкам-альбиносам, или морским свинкам с белыми боками, исследуемого вида атипичных микобактерий в дозе 1 мг/мл, отличающийся тем, что оценку сенсibiliзирующих свойств атипичных микобактерий проводят через 30-35 дней, после сенсibiliзации морских свинок, путем постановки симультанной аллергической пробы, с использованием двух доз КАМ -125 ЕД/0,1 мл и 25 ЕД/0,1 мл, инъектируемых внутрикожно в правую боковую поверхность кожи морских свинок, а также двух доз ППД для млекопитающих -25 МЕ/0,1 мл и 5 МЕ/0,1 мл, инъектируемых внутрикожно в левую боковую поверхность кожи морских свинок, определение через 24 часа значений интенсивности аллергической реакции на две дозы КАМ и две дозы ППД для млекопитающих и сравнение значений интенсивности аллергической реакции максимальной дозы КАМ и максимальной дозы ППД для млекопитающих между собой, а также сравнение значений интенсивности аллергической реакции минимальной дозы КАМ и минимальной дозы ППД для млекопитающих между собой, большая интенсивность значений аллергической реакции на две дозы КАМ в сравнении со

RU 2 715 220 C 1

## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2771778

**Комплексный аллерген для диагностики  
паратуберкулеза**

Патентообладатель: **ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ  
ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И Я.Р. КОВАЛЕНКО  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК" (ФГБУ ФНЦ ВИЭВ РАН) (RU)**

Авторы: **Найманов Али Хусинович (RU), Толстенко Нина Гавриловна  
(RU), Вангели Елена Петровна (RU), Мясоедов Юрий Михайлович  
(RU), Устинова Галина Ивановна (RU), Кучерук Оксана Дмитриевна  
(RU), Гулюкин Алексей Михайлович (RU), Муковнин Андрей  
Александрович (RU)**

Заявка № 2021121515

Приоритет изобретения 20 июля 2021 г.

Дата государственной регистрации  
в Государственном реестре изобретений  
Российской Федерации 12 мая 2022 г.

Срок действия исключительного права  
на изобретение истекает 20 июля 2041 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2800320

**Способ дифференциации *M. avium* subsp. *paratuberculosis* от других видов микобактерий на сенсibilизированных этими видами микобактерий морских свинках**

Патентообладатель: **ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК" (ФГБНУ ФНЦ ВИЭФ РАН) (RU)**

Авторы: **Найманов Али Хусинович (RU), Мясоедов Юрий Михайлович (RU), Вангели Елена Петровна (RU), Толстенко Нина Гавриловна (RU), Искандаров Марат Идрисович (RU), Федоров Андрей Иванович (RU), Искандарова Салмиханум Самурхановна (RU), Гулюкин Алексей Михайлович (RU)**

Заявка № **2022116560**

Приоритет изобретения **20 июня 2022 г.**

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **20 июля 2023 г.**

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает **20 июня 2042 г.**



Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов





**ЗОЛОТАЯ | 20**  
7-18 ОКТЯБРЬ  
**ОСЕНЬ | 20**

XXII РОССИЙСКАЯ АГРОПРОМЫШЛЕННАЯ ВЫСТАВКА

**ДИПЛОМ**

НАГРАЖДАЕТСЯ

**ЗОЛОТОЙ МЕДАЛЮ**

**ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук (ФГБНУ ФНЦ ВНЭВ РАН), г. Москва**

*«За разработку методических рекомендаций: «Применение сывороточной пробы с ПИД-туберкулином для выявления туберкулеза и комплексным аллергоном из антигенов микобактерий (КАМ) для индивидуального учета аллергических реакций, отбора реагирующих животных для диагностического убой и установления диагноза на туберкулез»*



МИНИСТР СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
 РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Д.Н. ПАТРУШЕВ



Министерство  
сельского хозяйства  
и продовольствия

# ЗОЛОТАЯ ОСЕНЬ 2022

XXIV ВСЕРОССИЙСКАЯ АГРОПРОМЫШЛЕННАЯ ВЫСТАВКА

## ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ

ЗОЛОТОЙ МЕДАЛЬЮ

**ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), г. Москва**

*«За разработку комплексного аллергена для диагностики паратуберкулеза»*

Министр сельского хозяйства  
Российской Федерации

Д.Н. ПАТРУШЕВ





# ЗОЛОТАЯ ОСЕНЬ 2022

XXIV ВСЕРОССИЙСКАЯ АГРОПРОМЫШЛЕННАЯ ВЫСТАВКА

## ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ

ЗОЛОТОЙ МЕДАЛЬЮ

**ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), г. Москва**

*«За серию монографий: «Бруцеллез», «Туберкулез», «Паратуберкулез»»*

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Д.Н. ПАТРУШЕВ