

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Работа выполнена в лаборатории хронических инфекций животных 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).

**Научные консультанты** - доктор ветеринарных наук, профессор Найманов Али Хусинович и доктор биологических наук Ездакова Ирина Юрьевна

**Официальные оппоненты:**

Макарова Марина Витальевна, доктор биологических наук, ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы», главный научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулёза и патоморфологии.

Черноусова Лариса Николаевна, доктор биологических наук, профессор, ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза», главный научный сотрудник отдела микробиологии.

Смолянинов Юрий Иванович, доктор ветеринарных наук, профессор, Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий Российской академии наук», главный научный сотрудник лаборатории туберкулёза сельскохозяйственных животных.

**Ведущая организация:** ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов».

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.249.01, созданного на базе ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН по адресу: 109472, г. Москва, ул. Рязанский проспект, д. 24 корп.1, тел.: 8 (495) 970-03-69.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН <http://viev.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023

Учёный секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук, доцент

Капустин А.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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 (Найманов А.Х., Гулюкин М.И., 2014).

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 (раннее 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 (Найманов А.Х., Калмыков В.М., 2018).

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 (Овдиенко Н.П., 2002; Гулюкин М.И. и др., 2012).

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 (Найманов А.Х. и др., 2022).

Приведенные доводы являются основанием, для разработки комплексного аллергена 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 (Jain M., et. al., 2020).

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 (Муковнин А.А. и др., 2021).

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

При аллергической диагностике паратуберкулёза различные авторы использовали либо ионин (паратуберкулин), изготовленный из микобактерий паратуберкулёза, 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 – intracellularae*, 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 (Ездакова И.Ю., 2008; AmrM.M., 2017).

Изложенное является обоснованием конструирования нового комплексного аллергена для аллергической диагностики паратуберкулёза, тем более, что в доступной литературе имеются противоречивые сведения о диагностической

ценности моновидовых аллергенов, изготовленных только из микобактерий птичьего вида или микобактерий паратуберкулёза.

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 дозировок 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, высокоспецифичных аллергенов, сравнительное изучение их свойств, совершенствование методических подходов, при контроле параметров качества, способов и методов применения в практических условиях, в соответствии современных Международных требований.

**Степень разработанности темы.** Для осуществления мероприятий по оздоровлению, и мероприятий по профилактике туберкулёза и паратуберкулёза крупного рогатого скота используется аллергический метод, предполагающий применение 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 иммунобиологическим параметрам относятся: биологическая активность, специфичность и реактогенность (European Pharmacopoeia 2002, 2007).

Изучение иммунобиологических критериев туберкулинов, в лабораторных условиях, на морских свинках включает: подготовительные этапы и этапы постановки теста, которые влияют на результат исследования (Безгин В.М., Козлов В.Е., 2003; Козлов В.Е. и др., 2011).

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 (Найманов А.Х. и др., 2020). Кроме того, в различных лабораториях, проводятся работы связанные с созданием новых аллергодиагностикумов и совершенствованием существующих, в отношении которых не разработаны соответствующие международные нормативные требования (Aagaard C. et. al., 2006).

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 аллергодиагностикумов.

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

**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 паратуберкулёза 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 свинок и на инфицированном *M. bovis* крупном рогатом скоте.
4. Определить оптимальную диагностическую дозу ППД туберкулина для млекопитающих, при постановке биопробы на морских свинок.
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 свинок, усилением сенсibilизирующих свойств микобактерий, для дифференциации *M. avium subsp. paratuberculosis* от других микобактерий.

#### **Научная новизна**

Определены оптимальные варианты сенсibilизации 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 сенсibilизированных 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 сенсibiliзирoванных морских свинок, путем усиления сенсibiliзирoвующих свойств.

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

Впервые изучена стабильность иммунобиологических параметров альттуберкулина Коха, туберкулина свободного от альбумоз, туберкулина на синтетической питательной среде концентрированного нагреванием, после периода длительного хранения, используемых ранее при диагностике туберкулёза 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 укупорки 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 сенсibiliзирoвующих свойств микобактерий и микобактериальных антигенов»; № 2715220, 13.11.2019, «Способ оценки сенсibiliзирoвующих 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 сенсibilизированных этими видами микобактерий морских свинках».

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

### **Основные 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 паратуберкулёза животных.

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

### **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 паратуберкулёза, проводили в соответствии нормативного документа: «Наставление по диагностике паратуберкулёза (паратуберкулёзного 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.

### **Степень достоверности и апробация результатов работы**

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.

#### **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.

**Личный вклад автора в проведенные исследования.** Работа выполнена автором самостоятельно, участие соавторов отражено в совместно опубликованных статьях.

**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.

## 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.

### Материалы и методы

**Штаммы микроорганизмов.** В работе использовали следующие микобактерии: *M. bovis*, штаммы: AN-5, 8-88, БЦЖ; *M. avium*, штамм 22-82; *M. intracellulareae*, штамм, S- 13С; *M. scrofulaceum*, штамм N-12; *M. fortuitum*, штамм 18023; *M. avium subsp. paratuberculosis* штамм 19698 ATCC.

**Питательные среды.** В исследованиях использовали следующие питательные среды: Павловского, мясопептонный агар, мясопептонный бульон, мясопептонный печеночный бульон, Сабуро, Тиоглеколовая, 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: ФКП «Курская биофабрика»); Туберкулин очищенный ППД для птиц (производитель: ФКП «Курская биофабрика»); Аллерген очищенный комплексный из атипичных микобактерий (производитель: ФКП «Курская биофабрика»); Аллергены очищенные комплексные из атипичных микобактерий, КАМ-2, 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. В работе было использовано более 1347 голов морских свинок. Всего проведено более 600 различных исследований.

Оценку содержания микобактериальных белковых соединений, осуществляли по методике Кьельдаля, определение концентрации водородных ионов были проведены с помощью стандартной методики.

Активность микобактериальных аллергенов оценивали на морских свинках, сенсibilизированных соответствующими видами микобактерий. Оценку биологической активности рассчитывали в сравнении с эталонными образцами. Активность эталонного туберкулина очищенного ППД для млекопитающих соответствовала 10000 МЕ/мг (Международных единиц Международного стандарта *PPD-bovine*). Активность эталонного туберкулина очищенного ППД

для птиц соответствовала 25000 МЕ/мг (Международных единиц Международного стандарта *PPD-avium*).

Оценку специфичности микобактериальных аллергенов осуществляли на гетерологично иммунизированных морских свинках. Специфичность микобактериальных аллергенов выражали в процентах. Значение менее 10% является критерием пригодности аллергена.

Определение реактогенности микобактериальных аллергенов осуществляли на морских свинках, которым внутрикожно инъецировали по 500 МЕ или 500 ЕД (Единиц активности) разведения микобактериального аллергена, с последующим учетом через 24 часа. Интенсивность реакции менее пяти мм. свидетельствует о пригодности аллергена.

Определение лейкоцитарной формулы осуществляли после отбора крови и приготовления мазков (окраска азур-эозином), и подсчета форменных элементов крови под масляной эмерсией, при увеличении  $\times 1000$ .

Определение фагоцитарной активности клеток крови осуществлялась с использованием частиц латекса.

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

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### Совершенствование условий оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов

Были проведены исследования по определению варианта сенсибилизации морских свинок, микобактериями разных видов, характеризующегося оптимальным соотношением чувствительности и специфичности, для оценки иммунобиологических параметров туберкулинов.

### Изучение сенсибилизирующих свойств микобактерий *M. bovis*

Сравнительные исследования вариантов сенсибилизации морских свинок вирулентными, авирулентными и инактивированными микобактериями бычьего вида, продемонстрировали предпочтительность использования внутрикожного введения авирулентных микобактерий *M. bovis* БЦЖ в дозе 0,2 мг.

### Изучение сенсibiliзирующих свойств микобактерий *M. avium*

Изучение сенсibiliзирующих свойств *M. avium* продемонстрировало, предпочтительность использования живых вирулентных микобактерий птичьего вида в сравнении, с вариантом предполагающем использование инактивированных микобактерий для сенсibilизации морских свинок, подкожно, в дозе 5 мг.

### Изучение сенсibiliзирующих свойств атипичных микобактерий

Учитывая результаты исследования сенсibiliзирующих свойств *M. avium*, а также сниженную сенсibiliзирующую способность нетуберкулёзных микобактерий, последующие исследования проведены с использованием только живых нетуберкулёзных микобактерий различных видов.

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

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

Оценка биологической активности микобактериальных аллергенов осуществляется с использованием нескольких доз тестируемого образца, в сравнении с контрольным препаратом. Вместе с тем граничные значения доз не определены.

### Определение эквивалентных оптимальных дозировок ППД туберкулина для млекопитающих

Определение оптимального диапазона доз ППД для млекопитающих осуществляли в группах морских свинок внутрикожно сенсibilизированных живыми авирулентными микобактериями бычьего вида, в дозе 0,2 мг. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Биологическая активность туберкулина очищенного ППД для млекопитающих с применением различных дозировок

Морские свинки, сенсibilизированные <i>M. bovis</i> , БЦЖ (Пониженные дозы туберкулина для млекопитающих, суммарное значение активности - 62 МЕ) (n=11)						
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
ПРЖ	100	100	100	100	100	100
Доверительный интервал - 60%- 167%; Биологическая активность- 9300 МЕ/см <sup>3</sup> .						
Морские свинки, сенсibilизированные <i>M. bovis</i> , БЦЖ (Повышенные дозы туберкулина для млекопитающих, суммарное значение активности - 310 МЕ), n=11						
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
ПРЖ	100	100	100	100	100	100
Доверительный интервал - 64%- 156%; Биологическая активность- 9500 МЕ/см <sup>3</sup> .						

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

Исследованиями продемонстрировано, что эквивалентными дозами, для оценки биологической активности туберкулина ППД для млекопитающих соответствуют: 62 МЕ - 310 МЕ (с учетом использования тестируемой и контрольной серий препаратов). Вместе с тем для осуществления различных сравнительных исследований диапазон дозировок может соответствовать: 1 -310 МЕ.

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

Оценку оптимального диапазона доз ППД для птиц проводили в группах морских свинок, подкожно, сенсibilизированных живыми микобактериями птичьего вида, в дозе 5 мг. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2 –Биологическая активность ППД для птиц при использовании различного диапазона доз

Морские свинки, сенсibilизированные <i>M. avium</i> (Пониженные дозы туберкулина для птиц, суммарное значение активности - 62 МЕ) (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
ПРЖ	100	100	100	100	100	100
Доверительный интервал - 68%-147%; Биологическая активность- 61230 МЕ/мг.						
Морские свинки, сенсibilизированные <i>M. avium</i> (Повышенные дозы туберкулина для птиц, суммарное значение активности - 310 МЕ) (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
ПРЖ	100	100	100	100	100	100
Доверительный интервал - 65%-154%; Биологическая активность- 58326 МЕ/мг.						

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

Исследованиями продемонстрировано, что эквивалентными для определения иммунобиологических параметров ППД для птиц, являются дозы: 62 МЕ-310 МЕ (с учетом использования тестируемой и контрольной серий препаратов). Для проведения сравнительных исследований туберкулина для птиц диапазон доз может быть: 1 -310 МЕ.

#### Определение эквивалентных оптимальных дозировок КАМ

Оценка диапазона доз КАМ, для оценки иммунобиологических параметров были осуществлены на морских свинках, подкожно сенсibilизированных смесью атипичных микобактерий: *M. scrofulaceum* и *M.intracellulareae*, в дозе 5 мг. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Биологическая активность КАМ при использовании различного диапазона доз на морских свинках сенсibilизированных смесью микобактерий *M. scrofulaceum* и *M. intracellulerae*

Морские свинки, сенсibilизированные смесью атипичных микобактерий <i>M. scrofulaceum</i> и <i>M.intracellulerae</i> (Пониженные дозы КАМ, суммарное значение активности - 62 ЕД), 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
ПРЖ	100	100	100	100	100	100
Доверительный интервал - 79%- 127%; Биологическая активность- 6000 ЕД/см <sup>3</sup>						
Морские свинки, сенсibilизированные смесью атипичных микобактерий <i>M. scrofulaceum</i> и <i>M.intracellulerae</i> (Повышенные дозы КАМ, суммарное значение активности - 310 ЕД), 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
ПРЖ	100	100	100	100	100	100
Доверительный интервал - 61%- 164%; Биологическая активность- 6700 МЕ/см <sup>3</sup>						

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

Исследованиями продемонстрировано, 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 -310 ЕД.

### **Совершенствование биологической модели микобактериальных инфекций животных**

Оценка биологической активности ППД туберкулина для млекопитающих на различных биологических моделях

Биологическая активность ППД для млекопитающих, в соответствии *Manual of standards for Diagnostic Tests and Vaccines* и ГОСТ 16739-88, рассчитывается по –разному, и может быть оценена на сенсibilизированных *M. bovis* морских свинках, и на крупном рогатом скоте, инфицированном микобактериями туберкулёза бычьего вида. В связи с указанным, следующим этапом исследования был сравнительный анализ вариантов расчета биологической активности ППД для млекопитающих, а также оценка активности туберкулина на различных биологических моделях.

Первоначально исследования были осуществлены на сенсibilизированных *M. bovis* штамм БЦЖ морских свинках, с использованием образцов ППД

туберкулина для млекопитающих, с различным содержанием белка. Результаты сравнения методик расчета активности представлены на рисунке 1.

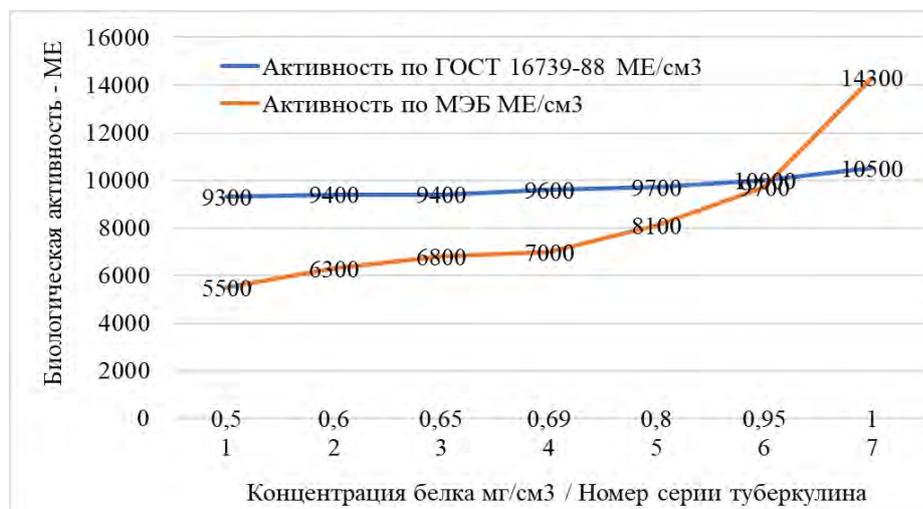


Рисунок 1 – Величина биологической активности ППД для млекопитающих, рассчитанная в соответствии ГОСТ16739-88 и методике МЭБ

Из полученных результатов исследования видно, что в соответствии методике МЭБ прослеживается зависимость: величина активности ППД для млекопитающих от концентрации белка, а в соответствии методики ГОСТ подобная зависимость не наблюдается.

Последующие сравнительные исследования биологической активности туберкулина для млекопитающих на сенсibilизированных *M. bovis* морских свинках и инфицированном микобактериями туберкулёза, крупном рогатом скоте, были осуществлены в соответствии методики МЭБ, при использовании двух образцов ППД для млекопитающих (с концентрацией белка: 0,9 мг/см<sup>3</sup> и 0,6 мг/см<sup>3</sup>).

Биологическая активность образцов ППД для млекопитающих на морских свинках и крупном рогатом скоте, характеризовалась значительным различием, при оценке образца туберкулина с минимальной концентрацией белка. Различий в активности при использовании образца туберкулина с максимальным содержанием белка в сопоставляемых группах не выявлено.

Таким образом, определение биологической активности ППД для млекопитающих на сенсibilизированных морских свинках, предпочтительнее, в сравнении с инфицированным крупным рогатым скотом.

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

Для снижения погрешности оценки биологических параметров микобактериальных аллергенов необходимо использование животных, характеризующиеся пониженной вариабельностью реакции ГЗТ. Исследованиями, на морских свинках, выявлена зависимость между интенсивностью кожной реакции ГЗТ и размером воспалительной реакции, в месте инъекции *M. bovis* БЦЖ, что позволяет формировать группы животных с пониженной вариабельностью туберкулиновой реакции ГЗТ. Сравнительный анализ, проведенный при использовании разработанного подхода и использованный ранее, представлен в таблице 4.

Таблица 4 – 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, мм
	25МЕ	5МЕ	1МЕ	
M±m	18±0,60	14,83±0,49	11,58±0,57	44,42±1,56
V	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, мм
	25МЕ	5МЕ	1МЕ	
M±m	17,46±0,42	15,29±0,30	11,63±0,31	44,38±0,32
V	8,41	6,75	9,19	2,5

Из полученных результатов видно, что предполагаемый подход характеризуется меньшей вариабельностью аллергической реакции ГЗТ и соответственно меньшей погрешностью, в сравнении с ранее использованным подходом.

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

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

На различных видах животных показано, что максимальная интенсивность кожной туберкулиновой реакции ГЗТ развивается через различные промежутки времени. У морских свинок максимальная интенсивность кожной туберкулиновой реакции, в соответствии различных литературных источников, регистрируется в период 24-48 часов.

Учитывая изложенное следующим этапом исследования было определение оптимального времени учета кожной реакции ГЗТ на различные микобактериальные аллергены, при использовании нескольких доз у морских свинок, сенсibilизированных не одинаковыми видами микобактерий. Результаты исследования представлены в таблице 5.

Таблица 5 –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 МЕ	1 МЕ	100 МЕ	10 МЕ	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
<b>ПРЖ</b>	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
<b>ПРЖ</b>	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
<b>ПРЖ</b>	90	30	100	80	100	60
<b>V(%)</b>	20,6	98,2	12	56,6	14,12	91,36

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

Выявлено, что максимальная интенсивность кожной туберкулиновой реакции ГЗТ, в группах морских свинок иммунизированных различными видами микобактерий, регистрируется через 24 часа, после введения разведений микобактериальных аллергенов. При этом в период 48 часов, регистрируется

небольшое увеличение вариабельности, а после 72 часов вариабельность значительно возрастает, и снижается интенсивность кожной реакции ГЗТ.

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.

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

В соответствии литературных источников, для оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов, морские свинки могут быть использованы однократно, а в соответствии других источников многократно. Очевидно, что ограниченное проведение тестов ГЗТ, является экономически затратным, что и определило следующий этап исследования. Результаты исследования представлены в таблице 6.

Таблица 6 – 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 сенсibilизированные <i>M. bovis</i>		Морские свинки сенсibilизированные <i>M. avium</i>		Морские свинки сенсibilизированные <i>M. scrofulaceum</i> и <i>M. intracellulerae</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 на микобактериальные аллергены, в группах морских свинок сенсibilизированных микобактериями разных видов, не превышала 25 мм и не снижалась менее 8 мм. в исследуемый период времени.

Таким образом, динамическая оценка ГЗТ, на различные дозы микобактериальных аллергенов демонстрируют отсутствие снижения интенсивности ГЗТ в течение 14 месяцев, что позволяет многократно использовать сенсibilизированных морских свинок, при изучении иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов.

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

При постановке биологической пробы, оценка развития туберкулезного процесса, у морских свинок, проводится посредством использования ППД туберкулина для млекопитающих - 25 ТЕ. При этом величина биологической активности дозировки туберкулина определена относительно предшествующего Международного стандарта *PPD-S*, который в настоящее время не используется, а повсеместно применяется Международный стандарт *PPD-bovine*. В результате проведенных исследований определено, что дозировка ППД для млекопитающих - 25 ТЕ (*PPD-S*), соответствует 5 МЕ, а 50 ТЕ (*PPD-S*) = 10 МЕ (*PPD-bovine*).

Принимая во внимание то, что туберкулин для млекопитающих характеризуется биологической активностью 6600-15000 МЕ., при стандартном разведении содержание единиц активности в диагностической дозе будет различным. Учитывая изложенное проведена оценка диагностической ценности диапазона доз. Результаты исследований представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Оценка диагностической ценности ППД туберкулина для млекопитающих с различным содержанием МЕ на морских свинок, 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	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
ПРЖ	100	100	100

Примечания: ПРЖ - процент реагирующих животных.

Из полученных результатов исследования видно, что коммерческие серии ППД для млекопитающих, с биологической активностью 6600-15000 МЕ (*PPD - bovine*) при разведении в 200 раз обуславливают активность 3,3-7,5 МЕ позволяющее в 100% выявлять состояние повышенной чувствительности обусловленные микобактериями бычьего вида.

Таким образом, определена оптимальная доза туберкулина для млекопитающих в современных Международных единицах для оценки биопробы на туберкулез.

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

Оценка активности микобактериальных аллергенов основана на механизме развития ГЗТ, в организме морских свинок. Вместе с тем в доступной литературе данные о стадийности туберкулезного процесса при введении морским свинкам микобактерий *M. bovis* БЦЖ отсутствуют, что определило следующий этап исследования.

В исследованиях было оценено содержание лейкоцитов, в крови морских свинок и изучен фагоцитоз латексных частиц, в период формирования состояния ГЗТ и развития туберкулиновой реакции.

В результате проведенных исследований выявлено, что к периодам развития состояния ГЗТ, а также формирования туберкулиновой реакции на введение ППД для млекопитающих, у морских свинок, сенсibilизированных

микобактериями бычьего вида, количество сегментоядерных нейтрофилов возрастает, при снижении количества лимфоцитов.

Результаты изучения фагоцитоза латексных частиц представлены в таблице 8.

Таблица 8– Динамика фагоцитарной активности нейтрофилов крови морских свинок, в период развития состояния ГЗТ, а также постановки туберкулиновой пробы

Показатель	Период после сенсibilизации морских свинок					
	Инта- ктные	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

Также исследования продемонстрировали, что максимальная интенсивность фагоцитоза регистрируется на 14 сутки с последующим снижением на 30 сутки, а также после постановки теста ГЗТ.

Таким образом, выявленные изменения содержания сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов в крови морских свинок характеризуют нейтрофильную фазу, при туберкулёзной инфекции.

**Совершенствование тестов оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов на лабораторных животных**  
Разработка инструментальных средств оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов

Тесты оценки иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов, включают несколько этапов, одним из которых является определение границ воспалительного процесса, методом визуального учета. Для снижения погрешностей при оценке границы воспалительного процесса, в месте инъекции туберкулина и соответственно повышения эффективности, нами разработано техническое устройство. Сравнительное исследование вариантов учета кожной реакции ГЗТ методом визуального учета и аппаратным методом представлены в таблице 9.

Таблица 9 – 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 визуального и аппаратного способов, представленные в таблице, демонстрируют равнозначный результат. Многократное тестирование биологических параметров микобактериальных аллергенов (активности и специфичности) продемонстрировало эргономичность технического устройства.

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

### **Разработка программного обеспечения определения иммунобиологических параметров качества микобактериальных аллергенов**

Заключительным этапом определения активности и специфичности микобактериальных аллергенов является статистическая обработка количественных значений каждой реакции ГЗТ, в соответствии стандартных формул, которая может быть осуществлена при использовании специализированного программного обеспечения. В рамках совершенствования методик контроля качества микобактериальных аллергенов, нами разработано специализированное программное обеспечение.

В программном обеспечении предусмотрено введение переменных: дата изготовления препарата, номер серии, дата тестирования, дата сенсibilизации морских свинок, интенсивность аллергической реакции на соответствующие дозировки тестируемого и контрольного образцов (миллиметры). Расчётными данными являются: логарифм относительной активности препарата ( $LgR$ ), усреднённый тангенс угла наклона прямых к оси абсцисс, средний диаметр

реакции, антилогарифм относительной активности (R), значение активности в МЕ или значение специфичности, выраженное в процентах, стандартная ошибка, доверительный интервал.

Таким образом, разработано специализированное программное обеспечение для оценки биологических параметров микобактериальных аллергенов.

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

#### Совершенствование способа оценки биологической активности КАМ

Комплексный аллерген из атипичных микобактерий характеризуется сложным составом, представленным смесью аллергенов выделенных из *M. scrofulaceum* и из *M. intracellulareae*, в отношении которого не разработаны соответствующие Международные стандарты. При этом учитывая антигенное сходство КАМ и ППД для птиц, последний можно использовать в качестве эталона активности, и таким образом определить активность КАМа. Для этого в предварительных исследованиях были рассчитаны парные дозы, обуславливающие приблизительно равнозначную интенсивность кожной туберкулиновой реакции КАМ и ППД для птиц. Оценку активности осуществляли на морских свинках сенсibilизированных смесью *M. intracellulareae* и *M. scrofulaceum*, а также морских свинках сенсibilизированных *M. avium*.

Полученный результат свидетельствует о большей гомологии КАМ, в отношении варианта сенсibilизации лабораторных животных атипичными микобактериями (коэффициент активности равен 0,95), в сравнении с группой животных иммунизированных птичьими микобактериями (коэффициент активности равен 0,31).

Учитывая предпочтительность использования в качестве контроля в отношении КАМ гомологичного аллергена были проведены исследования по разработке контрольной серии комплексного аллергена, составленного из аллергенов *M. intracellulareae* и *M. scrofulaceum*.

Оценка биологической активности моноаллергенов проведена с определением минимального количества белка обуславливающего требуемую интенсивность кожной реакции ГЗТ (7 мм). Результаты исследования изложены в таблице 10.

Таблица 10 – Определение активности моноаллергенов *M. intracellularae* и *M. scrofulaceum*

Сенсибилизация <i>M. intracellularae</i> (аллерген <i>M. intracellularae</i> )						
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
Сенсибилизация <i>M. scrofulaceum</i> (аллерген <i>M. scrofulaceum</i> )						
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

В результате проведенных исследований установлено, что Единица активности моноаллергена *M. intracellularae* составляет 0,000773 мг., а моноаллергена *M. scrofulaceum* составляет 0,00264 мг. При этом определено, что биологическая активность контрольного аллергена КАМ должна соответствовать 800 ЕД/см<sup>2</sup>.

Таким образом, оценку биологической активности комплексного аллергена из атипичных микобактерий целесообразно осуществлять на гомологичной сенсибилизации морских свинок *M. scrofulaceum* и *M. intracellularae*.

#### Совершенствование способа оценки специфичности КАМ

Следующим этапом исследования было совершенствование метода контроля специфичности КАМ, в соответствии Международных требований. Принимая во внимание дифференциально-диагностическое назначение КАМ, его специфичность следует оценивать в двух группах морских свинок: иммунизированных гомологичными микобактериями (смесью *M. intracellularae* и *M. scrofulaceum*); иммунизированных гетерологичными микобактериями (*M. bovis*). Результаты исследования представлены в таблице 11.

Таблица 11 – 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,	19,94±	14,22±	18,5±	12,61±	15,75±	11,0±	16,67±	11,33±
мм	0,87	0,85	0,47	0,65	0,31	0,49	0,38	0,41
ПРЖ	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>КАМ серия № 2</b>								
М±m,	20,63±	14,83±	19,75±	13,29±	16,13±	11,31±	12,75±	9,94±
мм	0,74	0,64	0,86	0,48	0,69	0,48	0,65	0,61
ПРЖ	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>КАМ серия № 3</b>								
М±m,	18,33±	12,61±	17,83±	12,5±	18,69±	13,63±	17,31±	12,44±
мм	0,37	0,54	0,57	0,22	0,56	0,97	0,36	0,63
ПРЖ	100	100	100	100	100	100	100	100

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

Из полученных результатов видно, что расчетные дозы КАМ и ППД для млекопитающих характеризуются выраженной реакцией ГЗТ соответствующие интервалу 8-25 мм., и проценту реагирующих животных равном 100. Последующие исследования продемонстрировали адекватность выработанного подхода. Таким образом, предложен вариант оценки специфичности комплексного аллергена из типичных микобактерий, в соответствии требований МЭБ.

### **Изучение стабильности иммунобиологических свойств микобактериальных аллергенов длительного периода хранения**

В настоящее время все промышленно производимые микобактериальные аллергены являются стабильными, что характеризует надежность применяемых технологий. При этом фундаментальное значение имеет оценка стабильности иммунобиологических свойств микобактериальных аллергенов, хранившихся в течение периода времени, многократно превышающем гарантированный период хранения.

Проведена сравнительная оценка стабильности микобактериальных аллергенов: туберкулина на синтетической питательной среде концентрированного нагреванием, туберкулина свободного от альбумоз,

изготовленные более 30 лет назад, а также альттуберкулина Коха, изготовленного в 40 годах прошлого столетия.

Оценку стабильности иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов осуществляли по параметрам: активность, специфичность и реактогенность.

Так биологическая активность альттуберкулина Коха равнялась 8000 МЕ/см<sup>3</sup> соответствующая диапазону: 6600-15000 МЕ/см<sup>3</sup>, в то время как туберкулин свободный от альбумоз и туберкулин на синтетической питательной среде концентрированный нагреванием характеризовалась сниженными значениями активности: 500 и 200 МЕ, соответственно.

Специфичность альттуберкулина Коха соответствовала 41%, в то время как туберкулин на синтетической питательной среде концентрированный нагреванием показал значения на уровне 58,5%, а туберкулин свободный от альбумоз на уровне 22%.

Изучение реактогенности альттуберкулина Коха и туберкулина на синтетической питательной среде концентрированного нагреванием, продемонстрировало не приемлемые, в соответствии современных требований значения, в то время как туберкулин свободный от альбумоз характеризовался ареактогенностью.

Таким образом, полученные значения активности и специфичности альттуберкулина Коха предполагает стабильность биологических свойств, так как его технология изготовления не предполагала очищение от низко специфичных, родовых микобактериальных антигенов. Вместе с тем туберкулин свободный от альбумоз и туберкулин на синтетической питательной среде концентрированный нагреванием демонстрировали нестабильность иммунобиологических свойств.

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

Для повышения эффективности аллергической дифференциальной диагностики туберкулёза крупного рогатого скота, в ВИЭВ были разработаны новые комплексные аллергены: КАМ-2 и КАМ-3.

- КАМ-2 изготовлен из часто выделяемых на территории РФ видов атипичных микобактерий, и обладающих сенсibiliзирующими свойствами (*M. scrofulaceum*– 2 гр., *M. intracellulareae*– 3 гр., *M. fortuitum* и *M. smegmatis*– 4 гр.);

– КАМ-3 изготовлен из 3 основных видов микобактерий, входящих в состав: ППД туберкулина для птиц (*M. avium* шт. 2282 – 3 гр.), КАМ (*M. scrofulaceum*– 2 гр.), КАМ-2 (*M. fortuitum*– 4 гр.).

Оценку диагностической ценности комплексных аллергенов изучали на морских свинках, сенсibilизированных микобактериями разных видов.

Проведенные исследования продемонстрировали, что по активности и специфичности КАМ-3 превосходит все испытанные аллергены. Так, все сенсibilизированные *M. bovis* БЦЖ морские свинки не реагировали на КАМ-2 и КАМ-3. Морские свинки, сенсibilизированные *M. avium* атипичными микобактериями, реагировали на ППД для птиц, КАМ, КАМ-2 и КАМ-3, интенсивность проявления аллергических реакций была в большей степени выражена на КАМ-3. Также проведенные исследования демонстрируют, что наибольшими сенсibilизирующими свойствами характеризуются нетуберкулёзные микобактерии: *M. intracellulae*, *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.

Последующая оценка стабильности КАМ-3 по параметрам: рН и концентрации белка, продемонстрировала сохранность значений, в период 3 года, при температуре от 2 до 8°C.

#### **Разработка технологии изготовления комплексного аллергена «Параавиум» и методик оценки его активности и специфичности**

В целях совершенствования методов контроля качества и способов применения, при аллергической диагностике паратуберкулёза крупного рогатого скота проведены исследования по разработке нового комплексного аллергена «Параавиум» и методик оценки его качества. Комплексный аллерген изготавливается по классической технологии приготовления туберкулина очищенного ППД для птиц, но с использованием двух видов микобактерий: *M. avium* № 22-82 и *M. avium* subspecies *paratuberculosis* №19698 ATCC), расширяющих антигенный спектр и повышающий чувствительность и специфичность внутрикожной туберкулиновой пробы, при аллергической диагностике паратуберкулеза.

Комплексный аллерген тестировали на стерильность, активность, специфичность и реактогенные свойства. Высев на питательные среды характеризовал препарат как стерильный. Учитывая антигенную гомологичность комплексного аллергена Параавиум - туберкулину ППД для птиц, оценка активности осуществлялась на животных сенсibilизированных микобактериями птичьего вида. Результаты исследования демонстрирует таблица 12.

Таблица 12 – 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)
1	19	16	11	17	14	11
2	17	14	10	16,5	15,5	10
3	18,5	13,5	14	18,5	16	12
4	18,5	14	11	17,5	15	11,5
5	17,5	14,5	11,5	18	16,5	13
6	17,5	12,5	8,5	15	12,5	9,5
7	18,5	15,5	10	18,5	15,5	10
8	17,5	14	10	18	13	8,5
9	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 номинальной контролю ППД для птиц, и предполагает оценку активности на морских свинках, сенсibilизированных микобактериями птичьего вида.

Оценку специфичности комплексного аллергена осуществляли на морских свинках сенсibilизированных авирулентными микобактериями бычьего вида. Результаты исследования представлены в таблице 13.

Таблица 13 – 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
<b>M±m</b>	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>

Специфичность комплексного аллергена «Параавиум» соответствовала значению 3,6%, что удовлетворяет требованиям МЭБ (до 10%). Таким образом, предложенный подход также может быть использован в дальнейшем, для оценки специфичности комплексного аллергена. Последующее изучение стабильности комплексного аллергена «Параавиум», по параметрам: рН и концентрации белка, продемонстрировала сохранность лекарственной формы в период 3 года, при температуре от 2 до 8°C.

Таким образом, разработана технология изготовления комплексного аллергена «Параавиум» и отработаны методики оценки его активности, специфичности и реактогенности, в соответствии международных требований.

**Разработка биологической модели воспроизведения ГЗТ на морских свинках, усилением сенсibiliзирующих свойств микобактерий для дифференциации *M. avium subsp. paratuberculosis* от других видов микобактерий**

Для повышения эффективности аллергической диагностики паратуберкулёза крупного рогатого скота и сравнительной оценки аллергена «Параавиум» была разработана биологическая модель, на морских свинках. Известно, что введение в организм морских свинок *M. avium subsp. paratuberculosis* не сопровождается развитием состояния ГЗТ, выявляемое в туберкулиновом тесте. Поэтому микобактерии паратуберкулёза в организм морских свинок вводили на адьюванте, из расчета 0,5 см<sup>3</sup> адьюванта (15 частей ланолина и 85 частей минерального масла) на 5 мг. микобактерий, подкожно в четыре места (2 в область холки и 2 в области крестца). Тестирование морских свинок аллергеном «Параавиум» и другими микобактериальными аллергенами выявило развитие состояния ГЗТ. При этом большая интенсивность проявления кожной реакции ГЗТ регистрировалась на «Параавиум» в сравнении с ППД для птиц и ППД для млекопитающих и 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 сенсibiliзации, по интенсивности проявления аллергических реакций ГЗТ на разные микобактериальные антигены дифференцировать *M. avium subsp. paratuberculosis* от других видов микобактерий.

## 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 аллергодиагностикумов. В результате проведенных исследований были выявлены значимые критерии, влияющие на результаты исследований, такие как вариант сенсibilизации 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 сенсibilизированных 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.

## 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 аллергических реакций 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 сенсibiliзирующими свойствами характеризуются нетуберкулёзные микобактерии: *M. intracellulerae*, *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 сенсibiliзации, по интенсивности проявления аллергических реакций ГЗТ на разные микобактериальные антигены дифференцировать *M. avium subsp. paratuberculosis* от других видов микобактерий.

15. Установлено, что усиление сенсibiliзирующих 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 адьюванта (ланолин, минеральное масло в соотношении 15:85 в 0,5 мл). Использование адьюванта позволяет пролонгировать сенсibiliзацию 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.

## **РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Ветеринарным и биотехнологическим специалистам, занятым в изготовлении и контроле биопрепаратов:

При контроле туберкулинов использовать морских свинок, сенсibilизированных эквивалентными дозами микобактерий и эквивалентные дозы микобактериальных аллергенов.

При оценке иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов использовать специализированное техническое приспособление и специализированное программное обеспечение.

Оценку специфичности комплексных аллергенов проводить параллельно с ППД для млекопитающих, в двух группах морских свинок: 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 ME 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 свинок, 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.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации, в рецензируемых, научных изданиях Перечня ВАК**

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. **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.

7. **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.

8. **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.

9. **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.

10. **Мясоедов Ю. М.** Оценка методов контроля качества микобактериальных аллергенов изготавливаемых с использованием *M. bovis*/ **Ю. М. Мясоедов**// Вестник КГСХА.- 2015.- №8.- С.209-212.

11.**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.

12. **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.

13.**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.

14. **Мясоедов Ю. М.** Модификация метода оценки кожной реакции ПЧЗТ при контроле микобактериальных аллергенов/ **Ю. М. Мясоедов** // Вестник КГСХА.-2016.-№9.-С.157-161.

15. 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.

16. **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.

17. **Мясоедов Ю. М.** Автоматизированный анализ параметров крови лабораторных животных/ **Ю. М. Мясоедов** // Вестник КГСХА.-2017.-№5.-С.25-28.
18. **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.
19. **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.
20. **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.
21. **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.
22. **Мясоедов Ю. М.** Оценка различных вариантов сенсibilизации морских свинок атипичными микобактериями/ **Ю. М. Мясоедов / Ю. М. Мясоедов**// Вестник КГСХА. -2018. -№6. -С.95-98.
23. **Мясоедов Ю. М.** Изучение динамики гематологических изменений у морских свинок при моделировании туберкулёзной инфекции опосредованной низко вирулентными микобактериями/ **Ю. М. Мясоедов**// Вестник КГСХА. -2018. -№3.-С.92-95.
24. **Мясоедов Ю. М.** Изучение сенсibilизирующих свойств атипичных микобактерий разных групп по классификации *Ranvon* / **Ю. М. Мясоедов, А.Х. Найманов** // Ветеринария и кормление.- 2019.-№4.- С.6-8.
25. **Мясоедов Ю. М.** Некоторые аспекты иммунопатогенеза туберкулёза (обзорная статья)/ **Ю. М. Мясоедов, И. Ю. Ездакова, А.Х. Найманов** // Актуальные вопросы ветеринарной биологии.- 2020.- Т.45.-№1.- С.12-21.
26. 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.-№2.-С.-25-29.
27. Естественный путь заражения морских свинок от больных туберкулёзом коров в неблагополучном хозяйстве/ А.Х. Найманов, М.С. Калмыкова, Н.Г. Толстенко, Е.П. Вангели, **Ю.М. Мясоедов**// Ветеринария и кормление.-2021.-№5.-С.53-56.

28. 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.

29. 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.

30. *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.*

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации, в других изданиях**

31. **Мясоедов Ю. М.** Изучение корреляционных зависимостей между критериями оценки субклинической формы туберкулезного процесса/ **Ю. М. Мясоедов**, С.В. Морозов //Материалы международной научно- практической конференции, посвящённой 125- летию ветеринарии курской области. Актуальные проблемы ветеринарной медицины» 22-23 мая 2008г.- Курск 2008.- С. 121-123.

32.**Мясоедов Ю. М.** Изучение иммуногенности разных доз *M. bovis* при моделировании ГЗТ/**Ю.М. Мясоедов**, С.В. Морозов // Материалы международной научно- практической конференции, 20- 22 января 2010г, г. Курск ч 5. Научное обеспечение агропромышленного производства. Курск, 2010. -С.11-13.

33.**Мясоедов Ю. М.** Изучение стабильности детрита инактивированных микобактерий *M. bovis* AN-5/ **Ю.М. Мясоедов**, С.В. Морозов // Материалы международной научно- практической конференции, 20- 22 января 2010г, г. Курск ч 5. Научное обеспечение агропромышленного производства. Курск, 2010.- С.17-20.

34.**Мясоедов Ю. М.** Изучение механизмов развития кожных реакций ГЗТ с помощью детектора инфракрасного диапазона/ **Ю.М. Мясоедов**, С.В. Морозов// Материалы международной научно- практической конференции, 26- 28 января 2011г, г. Курск ч 3. наука и инновации в сельском хозяйстве. Курск, 2011. -С.152-155.

35.Эталонные образцы аллергенов для контроля биологической активности аллергена комплексного из атипичных микобактерий (КАМ)/ **Ю.М. Мясоедов** [и др.] //Материалы международной научно- практической конференции 5-7 декабря 2012г. Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК. Щелково, 2012.- С.33-37.

36.Разработка варианта аллергической реакции для индивидуального учёта результатов кожной пробы при дифференциальной диагностике туберкулёза/ **Ю.М. Мясоедов** [и др.]// Материалы международной научно- практической

конференции 5-7 декабря 2012г. Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК. Щелково, 2012.- С.322-326.

37. **Мясоедов Ю. М.**, С.В. Морозов. Изучение влияния антигенной нагрузки ППД туберкулина для млекопитающих на частоту и интенсивность проявления туберкулиновых аллергических реакций/ **Ю.М. Мясоедов**, С.В. Морозов// Материалы международной научно- практической конференции, 25-27 января 2012г, г. Курск ч 3. Научное обеспечение агропромышленного производства. Курск, 2012.- С.20-22.

38. **Мясоедов Ю. М.**, С.В. Морозов. Определение величины биологической активности ППД туберкулина для млекопитающих при использовании различных дозировок/ **Ю.М. Мясоедов**, С.В. Морозов// Международная научно-практическая конференция, актуальные проблемы агропромышленного производства, 23-25 января 2013г. Курск, 2013.- С.218-220.

39. **Мясоедов Ю. М.** Оценка эффективности доз при лабораторной диагностике туберкулёза животных/ **Ю. М. Мясоедов**// Москва, 22-23 ноября 2018 г. Труды ВИЭВ ТОМ 80. Часть II. Москва, 2018.- С.257-260.

40. **Мясоедов Ю. М.** Оценка иммунобиологических параметров микобактериальных аллергенов *M. bovis* и *M. avium*/ **Ю. М.Мясоедов** // Международная научно-практической конференция «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК», посвященной 50-летию ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» 25-27 сентября 2019 года г. Щелково, 2019.- С.180-186.

41. **Мясоедов Ю.М.** Развитие методов биологического контроля туберкулинов, используемых для аллергической диагностики микобактериальных инфекций животных/ **Ю. М. Мясоедов** // «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов» Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию Армавирской биофабрики 20-21 августа 2021г. Армавир, 2021.-С.224.-234.

42. **Мясоедов Ю. М.** Оценка иммунобиологических свойств микобактериальных фракций/ **Ю. М. Мясоедов**// Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК. Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Ивана Васильевича Звягина. Москва, 2020. -С.111-114.

43. **Мясоедов Ю.М.** Аллергическая диагностика микобактериальных инфекций животных: перспективы развития и совершенствования/ **Ю. М.Мясоедов** // Актуальные проблемы лечения и профилактики болезней молодняка. Материалы Международной научно-практической конференции. Витебск.-2022.-С.104-106.

44. Мясоедов Ю.М., Найманов А.Х. Изучение стабильности биологических свойств микобактериальных аллергенов/ **Ю. М.Мясоедов, А.Х. Найманов//** Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов. Материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых. Лосино-Петровский. 2022.-С.83-88.

#### **Методические рекомендации**

45. Найманов А.Х.Профилактические, диагностические, ограничительные и иные мероприятия, установление и отмена карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов туберкулёза животных/ Найманов А.Х., Гулюкин А.М., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Калмыков В.М., Исаев Ю.Г., Донченко А.С., Донченко Н.А., Безгин В.М., Козлов В.Е., **Мясоедов Ю.М.**, Муковнин А.А-ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва.- 2019.-29с.

46. Найманов А.Х.Профилактические, диагностические, лечебные, ограничительные и иные мероприятия, установление и отмена карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию паратуберкулёза животных/Найманов А.Х., Гулюкин А.М., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Калмыков В.М., Исаев Ю.Г., Донченко А.С., Донченко Н.А., Безгин В.М., Козлов В.Е., **Мясоедов Ю.М.**, Муковнин А.А-ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва.- 2019.-26с.

47.Найманов А.Х.Применение симультанной пробы с ППД-туберкулином для млекопитающих и КАМ для индивидуального учета аллергических реакций, отбора реагирующих животных для диагностического убоя/ Найманов А.Х., Гулюкин А.М., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Калмыков В.М., Исаев Ю.Г., Донченко А.С., Донченко Н.А., Безгин В.М., Козлов В.Е., **Мясоедов Ю.М.**, Муковнин А.А. - ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва.-2020.-29с.

#### **Патенты**

48. Патент №110994 Российская Федерация, МПК А 61М 5/315 (2006.01). Шприц для введения животным суспензий лекарственных препаратов и антигенных субстанций; №2011118147/14: заявлено 05.05. 2011; опубликовано 10.12.2011/ **Мясоедов Ю. М.**, Морозов С.В. Заявитель и патентообладатель: ФГОУ КГСХА имени профессора И.И. Иванова.-6с.3 ил.

49. Патент №116472 Российская Федерация, МПК В65D 39/00 (2006.01). Пробка для укупорки стеклянных контейнеров, используемых в микробиологии; №201210095/12: заявлено 10. 01. 2012; опубликовано 27.05.2012/ **Мясоедов Ю. М.**, Морозов С.В. Заявитель и патентообладатель: ФГОУ КГСХА имени профессора И.И. Иванова.-8с.3 ил.

50. Патент №2517218 Российская Федерация, МПК А 61К 39/04 (2006.01). Способ моделирования гиперчувствительности замедленного типа у морских свинок на микобактерии *M. bovis*; заявлено 25.10.2012; опубликовано 27.05.2014/ **Мясоедов Ю. М.**, Морозов С.В. Заявитель и патентообладатель: ФГОУ КГСХА имени профессора И.И. Иванова.-8с. ил.

51. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2013617658 Российская Федерация, *Bioactive* 1.0; Заявлено 20.05.2013; дата Государственной регистрации в Реестре программ для ЭВМ 21.08.2013/ **Мясоедов Ю. М.**, Морозов С.В. Заявитель и патентообладатель: ФГОУ КГСХА имени профессора И.И. Иванова.-45с. ил.

52. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2014611927 Российская Федерация, *Specificity* 1.0; Заявлено 26.12.2013; дата Государственной регистрации в Реестре программ для ЭВМ 13.02.2014/ **Мясоедов Ю. М.**, Морозов С.В. Заявитель и патентообладатель: ФГОУ КГСХА имени профессора И.И. Иванова.-35с. ил.

53. Патент №140669 Российская Федерация, МПК А61В 6/00 (2006.01). Устройство определения морфологических количественных параметров воспалительного процесса, протекающего в коже лабораторных животных; №2014100617/14; заявлено 09. 01.2014; опубликовано 20. 05. 2014/ **Мясоедов Ю. М.**, Морозов С.В. Заявитель и патентообладатель: ФГОУ КГСХА академия имени профессора И.И. Иванова.-12с. ил.

54. Патент №2657837 МПК А61К 39/04 (2006.01). Способ выявления анергичного, больного туберкулезом крупного рогатого скота; №2017133978; заявлено 29. 09. 2017; опубликовано 15.06.2018/ Найманов А.Х., Муковнин А.А., **Мясоедов Ю.М.** Заявитель и патентообладатель: ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко.-10с. ил.

55.Патент №2691398 Российская Федерация, МПК G01N 33/569 (2006.01). Способ оценки сенсibiliзирующих свойств микобактерий и микобактериальных антигенов; №2018129004; заявлено 07 08 2018; опубликовано 13.06.2019 / **Мясоедов Ю. М.** Заявитель и патентообладатель: Мясоедов Ю.М..-8с. ил.

56.Патент № 2715220 Российская Федерация, МПК G01N 33/569 (2006.01). Способ оценки сенсibiliзирующих свойств атипичных микобактерий; №2019136596; заявлено 13.11.2019; опубликовано 26.02. 2020/ **Мясоедов Ю.М.** Заявитель и патентообладатель: Мясоедов Ю.М.-8с. ил.

57. Патент №2771778 Российская Федерация, МПК А61К 39/04 (2006.01). Комплексный аллерген для диагностики паратуберкулёза: №2021121515; заявлено 20. 07. 2021; опубликовано 20.07. 2021/ Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., **Мясоедов Ю. М.** Устинова Г.И., Кучерук О.Д., Гулюкин А.М.,

Муковнин А.А. Заявитель и патентообладатель: ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко.-10 с. ил.

58. Патент №2800320 Российская Федерация, МПК G 01N 33/48 (2023.05); A61B 10/00 (2023.05). Способ дифференциации *M. avium subsp. paratuberculosis* от других видов микобактерий на сенсibilизированных этими видами микобактерий морских свинках: 2022116560; заявлено 20.06. 2022; опубликовано 20. 07. 2023/ Найманов А.Х., **Мясоедов Ю.М.**, Вангели Е.П., Толстенко Н.Г., Искандаров М.И., Федоров А. И., Искандарова С.С., Гулюкин А.М. Заявитель и патентообладатель: ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко.-10 с. ил.

### Монографии

59. Найманов А.Х., **Мясоедов Ю.М.** аллергены и аллергическая диагностика микобактериальных инфекций животных (монография). Курск 2020г. 238с.

60. Найманов А.Х., Е.П. Вангели, **Ю.М. Мясоедов**, Н.Г. Толстенко, М.И. Искандаров, А.И. Федоров, С.С. Искандарова, А.М. Гулюкин. Хронические инфекции животных Туберкулёз. Монография. М. Спутник+, 2022. 320с.

61. Найманов А.Х., Вангели Е.П., Мясоедов Ю.М., Н.Г. Толстенко, Искандаров М.И., Федоров А.И., Искандарова С.С., Гулюкин А.М. Хронические инфекции животных. Паратуберкулез. Монография М. Спутник+, 2022. 126с.

**Благодарности.** Автор выражает искреннюю благодарность: Найманову А. Х., Ездаковой И. Ю., Гулюкину М. И., Гулюкину А. М., Искандарову М. И. Вангели Е. П., Толстенко Н. Г., Козлову В. Е., Безгину В. М., Гущину В.А., Мясоедову М. В., Мясоедову М. М., Дюминой В. В., Прусовой Л. Н., Кузязевой Н. В., Пузановой В. В., Баланину С. Н., без помощи и поддержки, которых данный труд не был бы реализован.