Обоснование создания комплексных аллергенов для дифференциальной диагностики туберкулеза

Justification for the creation of complex allergens for differential diagnosis of tuberculosis

Найманов А.Х.
г. Москва

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-5-3
УДК 619:616.98.579.873.21.636.22/28

Ключевые слова: туберкулёз, нетуберкулёзные микобактерии, крупный рогатый скот, симультанная проба, ППД туберкулин для млекопитающих, ППД туберкулин для птиц, КАМ, КАМ-2, КАМ-3, благополучное по туберкулёзу хозяйство, неспецифические реакции, учёт симультанной пробы, оценка реакции.

Key words: tuberculosis, non-tuberculous mycobacteria, cattle, simultaneous test, PPD-tuberculin for mammals, PPD-tuberculin for birds, CAM, CAM-2, CAM-3; farm, healthy on tuberculosis; nonspecific reactions, simultaneous test accounting, assessment of response.

Резюме. Представлены результаты исследований и обоснование теоретических и практических основ необходимости создания нового комплексного аллергена из нетуберкулёзных микобактерий (НТМБ) для дифференциации неспецифических реакций на туберкулин. Установлено, что на территории Российской Федерации от реагирующих на туберкулин животных с неспецифическими реакциями до 75% случаев выделяются быстрорастущие НТМБ 4 гр. по классификации Раньона. Комплексный аллерген из микобактерий (КАМ), используемый в ветеринарной практике с 1978 года, готовится из двух видов атипичных микобактерий: *M.scrofulaceum* (2 гр.) и *M.intracellulare* (3 гр.). Авторы считают, что на современном этапе борьбы с туберкулёзом крупного рогатого скота КАМ необходимо готовить из наиболее часто выделяемых микобактерий 2, 3 и 4 групп, обладающих сенсибилизирующими свойствами. На сенсибилизированных различными видами микобактерий морских свинок установлено, что из НТМБ 4 гр. наибольшими сенсибилизирующими свойствами обладают *M.fortuitum* и *M.scrofulaceum*. Основываясь на проведенных исследованиях, в ВИЭВ разработаны новые комплексные аллергены КАМ-2 и КАМ-3, изготовленные из микобактерий 2, 3 и 4 групп.

Summary. Presents the results of researches and substantiation of theoretical and practical bases of the necessity of creating of new complex allergen from non-tuberculous mycobacteria for differentiation of nonspecific reactions to tuberculin. It is established that in the territory of the Russian Federation from the animals reacting to tuberculin with non-specific reactions to 75% of cases are allocated fast-growing NTMB 4 gr. according to the classification of Runyon. Complex allergen from mycobacteria (CAM), used in veterinary practice since 1978, is prepared from two types of atypical mycobacteria: *M. scrofulaceum* (2 gr.) and *M. intracellulare* (3 gr.). The authors believe that at the present stage of the fight against tuberculosis of cattle, CAM should be prepared from the most frequently isolated mycobacteria 2, 3 and 4 groups, having sensitizing properties. On the Guinea pigs sensitized by different types of mycobacteria it was found that from NTMB 4 gr. the greatest sensitizing properties have *M. fortuitum* and *M. scrofulaceum*. Based on the conducted researches, new complex allergens CAM-2 and CAM-3 made of mycobacteria 2, 3 and 4 groups were developed in VIEV.

Атипичные микобактерии (нетуберкулёзные микобактерии, НТМБ) широко распространены в природе, что обуславливает их вездесущность в окружающей внешней среде и в живом организме. НТМБ выделяются повсеместно в различных федеральных округах и климатических зонах Российской Федерации. Анализ выявления НТМБ на территории нашей страны показывает, что наиболее часто от реагирующих животных с неспецифическими реакциями на туберкулин выделяются быстрорастущие НТМБ 4 гр. по классификации Раньона.

Г.К. Параскевов (1988) при исследовании 1033 проб биоматериала от реагировавших на туберкулин животных в 63 случаях выделял микобактерии, из них: 4 (6,3%) – патогенные; 59 (93,6%) – атипичные. Причём, основную долю (до 77,7%) составляли атипичные быстрорастущие микобактерии 4 гр. по классификации Раньона.

Анализ проведённых в ВИЭВ исследований показывает, что при бактериологическом исследовании биоматериала от реагировавших на туберкулин животных из благополучных по туберкулёзу хозяйств в большинстве случаев выделяются быстрорастущие атипичные микобактерии 4 группы по Раньону. Отчётные данные производственных ветеринарных лабораторий также подтверждают результаты этих исследований. Так, на территории России ветеринарные лаборатории выделяют атипичные микобактерии в следующем соотношении: 1 гр. – 2,0%; 2 гр. – 19,7%; 3 гр. – 16,8%; 4 гр. – 59,5% (А.Х. Найманов, 2004).

Н.С. Боганец (2006) указывает, что ветеринарные лаборатории выделяют атипичные микобактерии: 1 гр. – 3,9%; 2 гр. – 22,3%; 3 гр. – 14,7%; 4 гр. – 59,2%. В Сибирском регионе наиболее часто выделяют атипичные микобактерии 4 гр.: *M.phlei* – 12,5%; *M.peregrinum* – 11,1%; *M.smegmatis* – 10,1%; *M.fortuitum* – 8,3%.

М.В. Качкин (2007) в благополучных по туберкулёзу хозяйствах Новосибирской области выделял атипичные микобактерии, которые по групповому составу распределялись: 1 гр. – 3,1%; 2 гр. – 15,6%; 3 гр. – 12,5%; 4 гр. – 65,7%.

Н.И. Прокопьева (2004), М.П. Неустроев и соавт. (2009),

Авторы / Authors

А.Х. Найманов, д.в.н., профессор, заведующий лабораторией микобактериозов, labmys@mail.ru;
Г.И. Устинова, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии и молекулярной биологии;
Н.Г. Толстенко, к.в.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микобактериозов,
Е.П. Вангели, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микобактериозов,
О.Д. Кучерук, к.в.н., старший научный сотрудник лаборатории биохимии и молекулярной биологии;
В.М. Калмыков, к.в.н., старший научный сотрудник лаборатории микобактериозов;
Е.М. Сошникова, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биохимии и молекулярной биологии;
В.Ф. Поляков, к.б.н., профессор
ФГБНУ Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко (ВИЭВ). г. Москва
A.H.Naymanov, G.I.Ustinova, N.G. Tolstenko, E.P. Vangeli, O.D. Kucheruk, V.M. Kalmykov, E.M. Soshnikova, V.F. Polyakov

Н.А. Обоева (2010) установили, что в Якутии у реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота персистируют атипичные микобактерии, близкородственные микроорганизмы *Nocardia* и *Rhodococcus*, а также грибы рода *Aspergillus*. Причем атипичные микобактерии 4 группы выявляются до 75,0% случаев.

А.С. Донченко и соавт. (2011) считают, что основная причина проявления неспецифических реакций на туберкулин в благополучных хозяйствах – сенсibilизация крупного рогатого скота быстрорастущими атипичными микобактериями 4 гр.: *M.fortuitum* и *M.smegmatis*.

Представленные результаты различных авторов показывают, что на территории РФ повсеместно выделяются НТМБ, значительную часть которых (от 59,2 до 75,0%) составляют быстрорастущие микобактерии 4 гр. по классификации Раньона.

Со времени возникновения проблемы неспецифических реакций были предложены различные методы их дифференциации, однако, наибольшее признание и распространение во всем мире получил метод симультанной пробы с туберкулином для млекопитающих и для птиц.

В настоящее время в нашей стране для дифференциации неспецифических реакций применяют симультанную пробу с ППД для млекопитающих и КАМ, а также симультанную пробу с ППД для млекопитающих и ППД для птиц. Сведения об эффективности этих проб противоречивы. Так, одни авторы считают, что они обладают одинаковой эффективностью, вторые считают более эффективной симультанную пробу с ППД для птиц, третьи – симультанную пробу с КАМ.

В связи с тем, что в последние годы в благополучных хозяйствах Российской Федерации в основном устанавливают сенсibilизацию крупного рогатого скота атипичными микобактериями, а сенсibilизация *M.avium* выявляется редко, считается, что для дифференциации неспецифических реакций предпочтительно применять симультанную пробу с ППД для млекопитающих и КАМ.

Основным недостатком симультанной пробы является небольшая её эффективность, так как по сообщениям различных авторов из разных регионов, симультанная проба с ППД для млекопитающих и КАМ позволяет дифференцировать неспецифические реакции от 0 до 77% случаев. Кроме того, в соответствии с действующим наставлением, она является групповой и дает возможность ориентироваться в ситуации по туберкулезу лишь в целом по стаду или группе (не менее 6 голов) исследуемых животных.

Следует указать и тот факт, что в последние годы при использовании симультанной пробы с КАМ всё чаще стали получать неопределённые результаты исследований при групповом учёте результатов симультанной пробы. Тем не менее, мы считаем, что главная диагностическая ценность симультанной пробы в том, что при её применении значительно сокращается количество реагирующих на туберкулин животных. Диагностическому убою подлежат только животные, более интенсивно реагирующие на туберкулин или при их отсутствии – реагирующие в равной степени на ППД для млекопитающих и КАМ.

Проведённые нами исследования показывают, что учёт результатов симультанной пробы следует проводить индивидуально по каждой корове, так как, в последние годы, при групповом учёте симультанной пробы и использовании таблицы ведомости учета и таблицы определения достоверности различия реакций на туберкулин и КАМ, практически всегда получаются неопределённые результаты исследований.

Следует учитывать и тот факт, что в соответствии с утвержденными нормативными документами симультанная туберкулиновая проба используется в благополучных хозяйствах в целях дифференциации неспецифических реакций. В благополучных стадах реагирующие животные считаются только подозреваемыми в заражении туберкулезом. Решающим в установлении диагноза является патологоанатомическое или лабораторное подтверждение ту-

беркулёза у убитых с диагностической целью животных.

Поэтому, учитывая широкое распространение нетуберкулезных микобактерий, недостаточную изученность и противоречивые данные о сенсibilизирующих свойствах различных видов микобактерий, мы провели исследования по изучению сенсibilизирующих свойств этих микроорганизмов с целью выявления отдельных видов микобактерий, обладающих наибольшими сенсibilизирующими свойствами, для создания нового поколения КАМ.

Материалы и методы

Исследования по изучению сенсibilизирующей роли атипичных микобактерий, а также близкородственных бактерий *Nocardia* и *Rhodococcus* провели в Вышневолоцком филиале ВИЭВ (о. Лисий) на морских свинках. Предварительно всех морских свинок исследовали внутрикожной пробой с ППД для млекопитающих в дозе 5 МЕ (25 ТЕ) в 0,1 мл физиологического раствора. В опыт брали только морских свинок, не реагирующих на внутрикожное введение туберкулина. Морских свинок заражали *M.fortuitum*, *M.smegmatis*, *M.chelonei*, *M.vacciae*, *M.phlei*, *M.flavescens*, *M.peregrinum*, *M.intracellulare*, *M.scrofulaceum*, *N.transvalensis* и *R.bronchialis* в дозе 5 мг влажной бакмассы культуры микроорганизма в 1 мл физиологического раствора.

Через 21–30 суток после подкожного заражения морских свинок исследовали симультанной пробой с ППД туберкулином для млекопитающих в дозе 5 МЕ (25 ТЕ) и КАМ в дозе 10 ЕД, в объёме 0,1 мл физиологического раствора внутрикожно с левой и правой стороны в депилированные участки кожи на боках животных. Учёт аллергических реакций проводили через 24–48 ч. За положительную реакцию принимали гиперемии кожи и образование припухлости диаметром 5 мм и более в месте введения аллергенов.

Результаты исследований

Установлено, что при заражении морских свинок культурами микобактерий в дозе 5 мг в 1 мл физиологического раствора большое количество реагирующих животных выявлено при заражении *M.intracellulare* (3 гр.), *M.scrofulaceum* (2 гр.), *M.fortuitum*, *M.smegmatis*, *M.chelonei* и *M.flavescens* (4 гр.). Причём морские свинки реагировали на КАМ и на ППД для млекопитающих (кроме заражённых *M.flavescens* и *M.peregrinum*, которые реагировали только на КАМ).

Морские свинки, заражённые *Nocardia*, *Rhodococcus* и *M.phlei*, не реагировали на внутрикожное введение КАМ и ППД для млекопитающих.

Проведённые нами исследования показали, что при заражении культурами микобактерий в дозе 5 мг в 1 мл достигается определенный уровень сенсibilизации у морских свинок. Тем не менее, на эту дозу не реагировали животные, зараженные *N.transvalensis*, *R.bronchialis* и *M.phlei*.

На основании проведенных исследований и анализа результатов этих исследований в ВИЭВ разработаны 2 опытные лабораторные серии комплексного аллергена из микобактерий КАМ-2 и КАМ-3:

– КАМ-2 – опытная лабораторная серия комплексного аллергена из НТМБ, изготовленная из 4-х видов наиболее часто выделяемых на территории РФ и обладающих сенсibilизирующими свойствами атипичных микобактерий 2, 3 и 4 группы по классификации Раньона (*M.scrofulaceum* – 2 гр., *M.intracellulare* – 3 гр., *M.fortuitum* и *M.smegmatis* – 4 гр.).

– КАМ-3 – опытная лабораторная серия комплексного аллергена из НТМБ, изготовленная из 3-х основных видов микобактерий, входящих в состав: ППД туберкулина для птиц (*M.avium* шт. 2282, 3гр.), КАМ (*M.scrofulaceum* – 2 гр.), КАМ-2 (*M.fortuitum* – 4 гр.).

При сравнительном изучении диагностической ценности и дифференцирующей способности ППД туберкулина для птиц, КАМ, КАМ-2 и КАМ-3 на сенсibilизированных различными видами микобактерий морских свинок установлено, что КАМ-3 по активности и специфичности превосходит все испытанные аллергены.

В настоящее время проводятся сравнительные испытания диагностической ценности биофабричного КАМ и

опытных лабораторных серий КАМ-2 и КАМ-3 в благополучных по туберкулёзу хозяйствах, где выявляются реагирующие животные с неспецифическими реакциями на туберкулин.

Выводы

1. На территории Российской Федерации от реагирующих животных с неспецифическими реакциями на туберкулин и различных объектов внешней среды выделяются НТМБ: 1 гр. – 2,0%; 2 гр. – 19,7%; 3 гр. – 16,8%; 4 гр. – 59,5%.

2. В связи с широким распространением во внешней среде и выделением от реагирующих животных НТМБ для дифференциации неспецифических реакций целесообразно использование симультанной пробы с ППД туберкулином для млекопитающих и комплексного аллергена из микобактерий (КАМ).

3. В связи с тем, что сенсибилизацию организма крупного рогатого скота к туберкулину вызывают НТМБ 2, 3 и 4 гр. по Раньону, комплексный аллерген из микобактерий необходимо готовить из микобактерий указанных групп.

4. Из медленнорастущих НТМБ значительными сенсибилизирующими свойствами обладают *M.intracellulare* (3 гр.) и *M.scrofulaceum* (2 гр.). Из быстрорастущих микобактерий 4 гр. наибольшими сенсибилизирующими свойствами обладают *M.fortuitum* и *M.smegmatis*.

Заключение

В ВИЭВ изготовлены опытные лабораторные серии КАМ-2 и КАМ-3. КАМ-2 получен из 4-х видов атипичных микобактерий 2, 3 и 4 групп по классификации Раньона (*M.scrofulaceum* – 2 гр., *M.intracellulare* – 3 гр., *M.fortuitum* и *M.smegmatis* – 4 гр.). КАМ-3 изготовлен из 3-х основных видов микобактерий, входящих в состав: ППД туберкулина

для птиц (*M.avium* шт.2282, 3гр.), КАМ (*M.scrofulaceum* – 2 гр.), КАМ-2 (*M.fortuitum* – 4 гр.).

Литература

1. Боганец Н.С. Бактериологическая диагностика туберкулёза животных и её усовершенствование: автореф. дис. ... докт. вет. наук. - Омск, 2006. - 38 с.
2. Донченко А.С., Кисленко В.Н., Донченко Н.А. и др. Диагностика туберкулёза животных. - Новосибирск, 2011. - 246 с.
3. Качкин М.В. Комплексная оценка проявления туберкулиновых реакций у животных на территориальном и популяционном уровне с использованием информационных технологий: автореф. дис. ... канд. вет. наук. - Новосибирск, 2007. - 22 с.
4. Найманов А.Х. Аллергическая диагностика микобактериальных инфекций крупного рогатого скота: дисс. докт. вет. наук. - Москва, 1993. - 354 с.
5. Найманов А.Х. Проблемы диагностики и профилактики туберкулёза крупного рогатого скота в современных условиях / Ветеринарная патология. - 2004. - № 1 - 2 (9). - С. 18 - 23.
6. Найманов А.Х., Устинова Г.И., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П., Кучерук О.Д. Проблема неспецифических реакций на туберкулин и совершенствование симультанной пробы для дифференциальной диагностики туберкулёза крупного рогатого скота // Ветеринария. - 2015 г. - № 6. - С. 20 - 25.
7. Неустроев М.П., Прокопьева Н.И., Протодьякова Г.П. Мониторинг эпизоотической ситуации по туберкулёзу крупного рогатого скота в республике Саха (Якутия) / Сб. науч. трудов ВНИИБТЖ. - 2009. - С. 140 - 143.
8. Овдиенко Н.П., Косенко В.И., Найманов А.Х. и др. Видовая принадлежность микобактерий, выделяемых от крупного рогатого скота и из объектов внешней среды / Проблемы туберкулёза. - 1990. - № 1. - С. 46 - 48.
9. Параскевов Г.К. Причины сенсибилизации крупного рогатого скота к туберкулёзу и мероприятия в хозяйствах в зависимости от вида микобактерий: автореф. дис. ... канд. вет. наук. - Тбилиси, 1988. - 18 с.
10. Прокопьева Н.И. Особенности контроля эпизоотического процесса туберкулёза крупного рогатого скота в экстремальных условиях Якутии: автореф. дис. ... д-ра вет. наук. - Новосибирск, 2004. - 35 с.
11. Шаров А.Н. Аллергическая диагностика туберкулеза у животных: повышение её эффективности: дисс. докт. вет. наук. - Москва, 1989. - 373 с.