

ANTONI SPRYSZAK, CEZARIUSZ ŻÓRAWSKI, ZYGMUNT WISNIEWSKI

Krajowy standard tuberkuliny PPD ptasiej

Pracownia Immunologii Gruźlicy Instytutu Weterynarii
w Puławach

Kierownik: prof. dr A. SPRYSZAK

Puławskie Zakłady Przemysłu Bioweterynaryjnego
w Puławach

Dyrektor: dr H. ARCIUCH

Uzyskanie standaryzowanej tuberkuliny, preparatu o określonej aktywności biologicznej i swoistości, zależne jest od posiadania tuberkuliny standardowej, stanowiącej wzorzec, do którego można porównywać każdą serię wyprodukowanego preparatu.

Międzynarodowy standard tuberkuliny PPD ptasiej został opracowany w 1959 r. w Weybridge i w postaci zliofilizowanej przechowywany jest Statens Seruminstytut w Kopenhadze. Jako jednostkę tuberkulinową (j.t.) tuberkuliny ptasiej przyjęto, analogicznie jak w przypadku PPD ssaków, 0,0002 mg czystego białka (3, 4). Standard ten na zapotrzebowanie zainteresowanych placówek naukowo-badawczych wysyłany jest przez wyżej wymieniony Instytut w minimalnych ilościach. Wykorzystuje się go, w zasadzie, do opracowania i sprawdzania krajowego, roboczego standardu.

Wprowadzenie w naszym kraju standaryzowanej tuberkuliny PPD ptasiej do stosowania w teście porównawczym u bydła (6) stworzyło konieczność opracowania standardu tuberkuliny PPD ptasiej.

Materiał i metody

Tuberkulinę przeznaczoną dla opracowania krajowego standardu tuberkuliny PPD ptasiej wyprodukowano ze szczepu *M. avium* D4ER według dokumentacji obowiązującej w Puławskich Zakładach „Biowel”. Szczep D4ER otrzymano z Central Veterinary Laboratory, Weybridge. Zawartość oczyszczonego białka (PPD) w uzyskanej tuberkulinie określono mikro-metodą Kiejdahla i rozcieńczono ją do zawartości 1 mg białka w 1 ml. Aktywność biologiczną tej tuberkuliny porównano na świnkach morskich sztucznie uczulonych szczepem D4ER do aktywności biologicznej międzynarodowego standardu PPD tuberkuliny ptasiej, który otrzymano w stanie zliofilizowanym ze Statens Seruminstytut Department of Biological Standardization World Health Organization International Laboratory for Biological Standards, Copenhagen. Międzynarodowy standard rozcieńczono wodą destylowaną do zawartości 1 mg białka w 1 ml, co odpowiada 50.000 j.t./ml. Rozcieńczenie tuberkulin do zawartości 1 mg/ml przyjęto jako rozcieńczenie „podstawowe”. Dalsze rozcieńczenia tuberkulin sporządzano używając M/30 bufor fosforanowy o pH 7,0.

Świnki morskie, albinosy, o ciężarze ciała 400—500 gramów, uczulano jednorazowym wstrzyknięciem w mięśnie uda 2 mg zabitych prątków szczepu *M. avium* D4ER, zawieszonych w oleju parafinowym (5). Do badań biologicznych użyto łącznie 60 świnek morskich, w tym 40 — uczulonych i 20 nieuczulonych.

Liczbę jednostek tuberkulinowych w 1 ml przygotowanej tuberkuliny określono na 8 uczulonych świnkach morskich. W tym celu wstrzyknięto im, w wygoloną skórę, na jednej stronie ciała tuberkulinę standardową w dawkach zawierających 1, 2, 5, 10, 20 i 50 j.t., na drugiej stronie ciała analogiczne rozcieńczenia badanego preparatu. Czterem nieuczulonym świnkom morskim wstrzyknięto międzynarodowy standard w dawce 100 j.t., a na drugiej stronie ciała

analogiczną dawkę tuberkuliny badanej. Iniekcje tuberkulin dokonywano przed upływem jednej godziny od chwili przygotowania rozcieńczeń, używając strzykawki z podziałką 0,01 ml i igły produkcji angielskiej, firmy Evertt. Objętość każdej wstrzykiwanej dawki wynosiła 0,1 ml. Wyniki odczytano po 24 godzinach. Wielkość reakcji, stanowiącą średnią dwóch pomiarów (poprzecznego i podłużnego) zaczerwienienia skóry, wyrażano w milimetrach. Po ustaleniu u poszczególnych świnek morskich tzw. reakcji wskaźnikowej (7 mm) na tuberkulinę standardową i na tuberkulinę badaną obliczono liczbę jednostek tuberkulinowych w 1 ml tuberkuliny badanej (1). Następnie tuberkulinę rozlano do ampulek w takiej ilości, aby każda ampulka zawierała preparat o zawartości 2 mg białka, co odpowiada 100.000 j.t., po czym zliofilizowano. Uzyskano 90 ampulek preparatu.

Zawartość białka w zliofilizowanym preparacie w dziesięciu losowo wybranych ampulkach sprawdzono mikro-metodą Kiejdahla, przyjmując mnożnik przeliczeniowy dla białka tuberkulinowego 7.

Aktywność biologiczną zliofilizowanego preparatu badano 4-krotnie. Dla każdego badania używano 8 świnek morskich uczulonych i 4 — nieuczulone. W badaniach tych stosowano międzynarodowy standard w dawkach 4, 20 i 100 j.t. i odpowiadające tym dawkom rozcieńczenia badanego preparatu. Każdą dawkę wstrzykiwano w wygoloną skórę w inne miejsce, przyjmując za słuszną sugestią Eissnera (2), że wyklucza to ewentualną możliwość wpływu różnej wrażliwości różnych miejsc skóry na wyniki badań.

Takie same dawki tuberkuliny standardowej i badanej wstrzykiwano w analogiczne miejsca na obu stronach ciała świnki morskiej. U czterech świnek morskich tuberkulinę standardową wstrzykiwano na prawej stronie ciała, tuberkulinę badaną na lewej, u następnych czterech zwierząt zaś odwrotnie. Iniekcje tuberkulin dokonywano w sposób podany wyżej. Po upływie 24 godzin dokonywano pomiarów wszystkich reakcji. Suma pomiarów reakcji na wszystkie dawki stanowiła podstawę dla obliczenia procentu aktywności badanego preparatu w stosunku do aktywności międzynarodowego standardu tuberkuliny, przyjmując jego aktywność równą 100. Średnie reakcje obliczone dla poszczególnych dawek pozwalały wykreślić krzywe ilustrujące aktywność obu tuberkulin.

Swoistość preparatu zbadano na 10 krowach gruźliczych i 8 krowach wolnych od gruźlicy. Przeprowadzono tuberkulinizację porównawczą, stosując tuberkulinę PPD ssaków oraz tuberkulinę badaną i tuberkulinę ptasią Weybridge w dawkach przyjętych dla porównawczego testu tuberkulinowego (tub. ssaków 10.000 j.t., tub. ptasia 2500 j.t.).

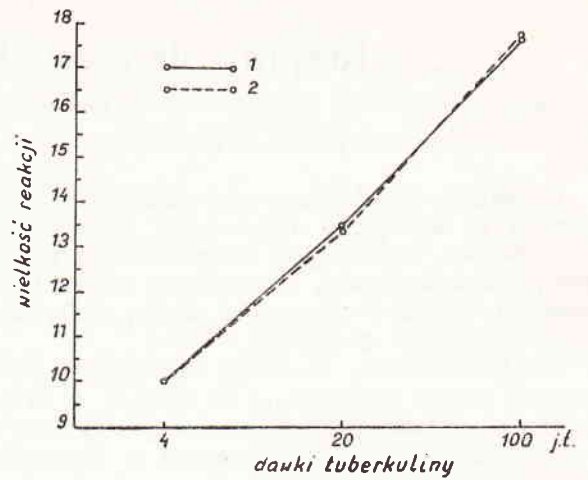
Wyniki

W tab. 1 przedstawiono wyniki badania wyprodukowanej tuberkuliny dla określenia jej aktywności biologicznej, wyrażonej w jednostkach tuberkulinowych, w porównaniu do międzynarodowego standardu PPD tuberkuliny ptasiej.

W tabeli podano dawkę wskaźnikową, to jest tę ilość tuberkuliny, która wywołała u świnki morskiej reakcję wskaźnikową (7 mm). U wszystkich świnek morskich reakcje wskaźnikowe wywołane były przez takie same dawki obu tuberkulin. U jednej świnki morskiej (nr 4) reakcje wskaźnikowe mieściły się między dawkami 2 i 5 j.t. w zakresie reakcji 6—9 mm. Przeprowadzana interpolacja (1) wykazała, że dawka wskaźnikowa dla obu tuberkulin wynosiła 3 j.t. Według średniej obliczeń na 8 świnkach morskich 1 ml

Tab. 1. Liczba jednostek turberkulinowych w 1 ml badanej turberkulinie

Nr kol. świnki morskiej	Dawka wskaźnikowa				Miano turberkulin badanej (liczba j.t. w 1 ml)
	Rozcieńczenie turberkulin		jednostek turberkulin		
	standard.	badana	standard.	badana	
1	1:1000	1:1000	5	5	50.000
2	1:1000	1:1000	5	5	50.000
3	1:1000	1:1000	5	5	50.000
4	1:2500	1:2500			
	-1:1000	-1:1000	3	3	50.000
5	1:1500	1:1500	10	10	50.000
6	1:2500	1:2500	2	2	50.000
7	1:1000	1:1000	5	5	50.000
8	1:2500	1:2500	2	2	50.000
8 świnek morskich — razem					400.000
średnio					50.000



Ryc. 1. Krzywe aktywności biologicznej turberkulinie badanej i standardowej na uczulonych świnkach morskich. 1 — międzynarodowy standard PPD turberkulinie ptasiej 2 — krajowy standard PPD turberkulinie ptasiej

turberkulinie badanej zawierał 50.000 j.t. Świnki morskie nieuczulone nie reagowały na turberkulinie w dawkach 100 j.t.

Zawartość białka turberkulinowego w preparacie zliofilizowanym wynosiła w poszczególnych ampulkach 2,02, 2,02, 2,02, 2,12, 2,12, 2,12, 2,06, 2,06, 1,87, 1,97 mg.

Wyniki czterokrotnych badań na uczulonych świnkach morskich aktywności biologicznej zliofilizowanego preparatu w porównaniu do międzynarodowego Standardu PPD turberkulinie ptasiej przedstawiono w tab. 2 oraz na ryc. 1.

W dwóch badaniach przeciętna średnich reakcji na dawki 4, 20, 100 j.t. turberkulinie standardowej była nieco wyższa, aniżeli przeciętna reakcji na analogiczne dawki (rozcieńczenia) turberkulinie badanej (St.: 14,0, 14,0, B.: 13,9, 13,7). W dwóch innych badaniach wartości te ukształtowały się odwrotnie (St.: 13,6, 13,0, B.: 13,7, 13,4). We wszystkich badaniach nieuczulone świnki morskie nie reagowały na turberkulinie w dawkach 100 j.t. Przyjmując, że aktywność biologiczna turberkulinie standardowej wynosi 100, procent aktywności biologicznej turberkulinie badanej w poszczególnych badaniach wahał się od 97,8 do 103,0. Średnie wielkości uzyskane w wyniku czterech badań okazały się jednakowe. Aktywność biologiczną turberkulinie badanej w porównaniu do aktywności biologicznej turberkulinie standardowej ilustruje ryc. 1.

Wyniki turberkulinizacji porównawczej 10 krów gruźliczych, z użyciem turberkulinie badanej i turber-

kulinie PPD ptasiej produkcji Weybridge z równoczesnym zastosowaniem turberkulinie PPD ssaków przedstawia tab. 3.

Wielkość odczynów na turberkulinie ptasią produkcji Weybridge i turberkulinie badaną u poszczególnych zwierząt była różna, natomiast średnia odczynów była bardzo zbliżona i wynosiła odpowiednio 7,0 i 6,9 mm. Reakcje na turberkulinie ssaków (homologiczną) były znacznie większe. Średnia wszystkich odczynów wynosiła 19,5 mm. Krowy wolne od gruźlicy na turberkulinie nie reagowały.

O m ó w i e n i e

Turberkulina przygotowana ze szczepu *M. avium* D4ER, przeznaczona do opracowania krajowego standardu, zawierała białko turberkulinowe o aktywności biologicznej równej aktywności biologicznej międzynarodowego standardu PPD turberkulinie ptasiej. Reakcje wskaźnikowe u 8 uczulonych świnek morskich wywołane były przez takie same dawki obu turberkulin. Przyjęto więc, że 1 mg białka turberkulinie badanej zawierał 50.000 j.t. Turberkulina, rozlana do ampulek po 2 ml, została zliofilizowana. Zliofilizowany preparat badanej turberkulinie winien zawierać 2 mg białka o aktywności biologicznej równej 100.000 jed-

Tab. 2. Średnie pomiarów reakcji na turberkulinie standardową (St) i na turberkulinie badaną (B) oraz procent aktywności biologicznej turberkulinie badanej w porównaniu do turberkulinie standardowej (4) badania na uczulonych świnkach morskich)

Dawka turberkulin (rozcieńczenie)		Średnie pomiarów reakcji na poszczególne dawki turberkulin									
		w b a d a n i a c h								w czterech badaniach	
		1		2		3		4		St.	B.
St.	B.	St.	B.	St.	B.	St.	B.	St.	B.	St.	B.
1: 50 = 100 j.t.	1: 50	17,8	17,9	16,8	17,5	17,6	17,5	18,1	18,0	17,6	17,7
1: 250 = 20 j.t.	1: 250	13,3	13,1	12,9	12,9	13,6	13,6	14,0	13,5	13,5	13,4
1:1250 = 4 j.t.	1:1250	9,9	10,2	9,3	9,7	10,7	10,7	10,0	9,6	10,0	10,0
Średnie pomiarów reakcji na wszystkie dawki		13,6	13,7	13,0	13,4	14,0	13,9	14,0	13,7	13,7	13,7
% aktywności biologicznej		100	100,7	100	103,0	100	99,3	100	97,8	100	100

nostek tuberkulinowych. Dalsze badania dotyczyły tuberkuliny w stanie zliofilizowanym. Zawartość białka, określona mikrometodą Kjedahlą w 10 ampulkach, wahała się w granicach 1,87—2,12. Uwzględniając błąd metody, można przyjąć, że poszczególne ampułki zawierają 2 mg białka tuberkulinowego. W badaniach biologicznej aktywności zliofilizowanego preparatu zastosowano, przyjętą w Weybridge, metodę pozwalającą na obliczenie procentu aktywności tuberkuliny badanej w porównaniu do aktywności tuberkuliny standardowej (3). Stosując 3 dawki tuberkuliny (4, 20 i 100 j.t.), w czterech badaniach na 32 uczulonych świnkach morskich, dokonano 96 obliczeń dla każdej tuberkuliny. Wykorzystując sumy pomiarów, obliczono średnie pomiarów reakcji na poszczególne dawki tuberkulin w kolejnych badaniach oddzielnie, jak również w czterech badaniach razem (tab. 2), Stosując tę metodę obliczania wyników, zmniejsza się do minimum błąd, z jakim zawsze należy liczyć się w badaniach biologicznych.

Wyniki 4-krotnie powtarzanych badań na świnkach morskich, uczulonych szczeniem homologicznym, wykazały, że aktywność biologiczna preparatu w stanie zliofilizowanym jest równa aktywności biologicznej międzynarodowego standardu PPD tuberkuliny ptasiej (tab. 2., ryc. 1). Wyniki badania zliofilizowanej tuberkuliny ptasiej na bydło gruźliczym wykazały, że swoistość tego preparatu jest bardzo zbliżona do swoistości standaryzowanej tuberkuliny ptasiej produkcji Weybridge (tab. 3).

Tab. 3. Wyniki turberkulinizacji porównawczej 10 krów gruźliczych

Lp.	Nr oborowy	Różnica grubości fałdu skóry (RGF)		
		t u b e r k u l i n a		
		ssaków	ptasia Weybridge	ptasia badana
1	272	16,8	10,6	14,2
2	0102	11,7	8,2	8,6
3	0164	11,9	4,4	5,5
4	264	20,8	7,4	8,4
5	274	27,0	8,8	8,2
6	81	20,6	12,2	9,5
7	249	26,9	3,6	4,9
8	89	44,0	9,2	3,7
9	296	9,1	4,1	5,4
10	266	6,5	1,6	0,7
Średnia		19,5	7,0	6,9

Każdą ampulkę preparatu oznakowano nadrukiem: „Krajowy Standard PPD ptasiej. 2 mg PPD = 100.000 j.t. I. Wet. Puławy, 1968” Preparat przechowywany jest w Pracowni Immunologii Gruźlicy Instytutu Weterynarii w Puławach.

Wnioski

1. Przygotowana ze szczepu *M. avium* D4ER tuberkulina PPD ptasia, w stanie zliofilizowanym, zawiera 2 mg białka tuberkulinowego w ampulce = 100.000 j.t.

2. Takie same ilości białka tuberkulinowego wyprodukowanego preparatu i międzynarodowego standardu PPD tuberkuliny ptasiej posiadają taką samą względnie bardzo zbliżoną aktywność biologiczną.

3. Preparat może służyć jako krajowy standard (wzorzec) tuberkuliny PPD ptasiej.

Podziękowanie. Autorzy wyrażają podziękowanie dr habił. Jadwidze Grundboeck za konsultacje w sprawie przeprowadzanych analiz chemicznych.

Piśmiennictwo

1. Brill J., Polityńska E.: Tuberkulina PPD, PWRL, 1960.
2. Eissner G.: Mh. Tierhk. 7, 133, 1955.
3. Lesslie I. W., Hebert C. N.: The standardization of tuberculin by biological assay. Trans. Health and Tuberc. Conf., Abadan, Nigeria, 1962.
4. Lesslie I. W.: The tuberculin test and the laboratory diagnosis of tuberculosis, Symp. Zool. Soc. Lond. No. 4, 11, 1961.
5. Lesslie I. W., Zórawski C.: Yield and specificity of tuberculin PPD derived from four strains *Mycobacterium avium* and a comparison of some antigenic properties of these strains, Tubercle, London (w druku).
6. Spryszak A., Zórawski C.: Medycyna Wet. 24, 397, 1968.

Adres autora: prof. dr Antoni Spryszak, Puławy, Al. Partyzantów 55, Instytut Weterynarii.

SIEMIENIUTA A. T.: Podnieśmy zoohigieniczne wymogi w stosunku do budownictwa pomieszczeń dla zwierząt. (Powysim zoogigijenickije triebowanija kstoitielstvu żywotnowodczeskich pomieszczenij). Wietierinaria (Moskwa) 46, 2, 83, 1969.

Zagadnienie mikroklimatu w pomieszczeniach dla zwierząt posiada istotne znaczenie dla utrzymania ich zdrowotności.

Za główną przyczynę złego mikroklimatu i skraplania się pary na ścianach i suficie uważa autor przede wszystkim nieodpowiednie przewodnictwo cieplne. Ściany obór mogą być suche i odpowiadać wymogom zoohigienii jeśli współczynnik hamowania przewodnictwa cieplnego (WHPC) ściany wyniesie co najmniej $1,2^{\circ}/m^2/godz./ckal$. W tych warunkach temperatura wewnętrznej powierzchni ściany wynosi w zimie $6,8^{\circ}$, a temperatura punktu rosy $6,1^{\circ}$, więc skroplenie nie następuje. W miejscach, gdzie ściana styka się z sufitem i w kątach WHPC winien być jeszcze większy.

Co do stropodachu, to aby podstawowa część jego została sucha odnośnie WHPC musi wynieść $1,8^{\circ}/m^2/godz./ckal$, co zapewnia temperaturę powierzchni $9,9^{\circ}$ przy punkcie rosy $7,8^{\circ}$. Stosowane zwykle pokrycie o WHPC wynoszącym $1,1-1,3^{\circ}/m^2/godz./ckal$ posiada niedostateczną izolację cieplną i skrapla się na nim woda. Co do podłogi to dobre wyniki termiczne dają płytki z keramzytu (50%), wapniaka (13—32%), szlaki (15%), azbestu (6%) i masy bitumicznej (13—14%). Podłoga z nich przy temp. powietrza $9,8^{\circ}$ wykazała ok. $15,2^{\circ}$ (drewniana — $14,4^{\circ}$) i była dostatecznie trwała.

Co do wentylacji to minimalna wymiana powietrza w zimie winna wynieść $17 m^3/godz.$ a optymalna $20-30 m^3/godz.$ — na 1 q ciężaru ciała bydła — co wymaga albo elektrowentylacji albo b. dobrego zaplanowania wentylacji rozprowadzonej po całej oborze. Wilgotność powietrza winna wynosić do ok. 85%. Autor zwraca uwagę na wielką rolę lek. wet. przy planowaniu i budowie pomieszczeń dla zwierząt.

T. J.