

CEZARIUSZ ŻÓRAWSKI, TADEUSZ KARPIŃSKI, ZYGMUNT WIŚNIEWSKI

Badania nad tuberkuliną PPD bydlęcą sporządzoną ze szczepu *Myc. bovis* AN₅

Z Pracowni Immunologii Gruźlicy Instytutu Weternarii w Puławach
Z Puławskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego

Tuberkulina PPD ssaków, stosowana w Polsce w rutynowych badaniach bydła i innych zwierząt na gruźlicę, produkowana jest z trzech szczepów prątka typu ludzkiego (*Myc. tuberculosis* C, DT, PN). Ścisłe pokrewieństwo antygenowe prątków typu ludzkiego i bydlęcego oraz łatwość uzyskiwania dużych ilości białka tuberkulinowego z wymienionych szczepów *Myc. tuberculosis*, sprawiły, że w wielu krajach wykorzystywano je do produkcji tuberkuliny ssaków, przeznaczonej do rozpoznawania gruźlicy bydlęcej u zwierząt.

Z punktu widzenia naukowego było sprawą oczywistą, że do wykrywania zwierząt zakażonych prątkiem bydlęcym winna być stosowana tuberkulina sporządzona z prątków bydlęcych. Na przeszkodzie temu stały trudności z uzyskiwaniem ze szczepów *Myc. bovis*, z natury swej skąpo rosnących, odpowiednich, na skalę przemysłową, ilości białka tuberkulinowego. Droga pewnych zabiegów hodowlanych udało się jednak przystosować pewne szczepy prątków bydlęcych do produkcji tuberkuliny. W krajach EWG zalecono wykorzystanie do tego celu szczepów bydlęcych AN₅, Vallée lub Bering (5). Pierwszy z tych szczepów jest od szeregu lat używany do produkcji tuberkuliny bydlęcej w wielu krajach zachodnich, a ostatnio także w Wielkiej Brytanii. Podjęcie przez Central Veterinary Laboratory, Weybridge, produkcji tuberkuliny na szczepie *Myc. bovis* AN₅ poprzedziły szerokie badania laboratoryjne i terenowe.

Lesslie (2) stwierdził, że białko tuberkulinowe *Myc. bovis* AN₅ wykazuje, u zwierząt i ludzi zakażonych prątkiem bydlęcym, około 50% większą aktywność, niż wagowo taka sama ilość białka *Myc. tuberculosis* C, DT, PN. Według tego autora 1 mg PPD *Myc. bovis* AN₅ odpowiada 75 000 j.t. Inne badania (3, 4, 5) wykazały, że tuberkulina bydlęca ujawnia mniej nieswoistych uczuleń występujących u bydła, niż tuberkulina ssaków sporządzona z prątków typu ludzkiego.

Celem niniejszej pracy było sporządzenie tuberkuliny ze szczepu *Myc. bovis* AN₅ oraz wstępna ocena jej wartości w rozpoznawaniu gruźlicy bydła w warunkach naszego kraju. Założono też zmodyfikowanie „klucza” do oceny wyników testu pojedynczego i porównawczego z użyciem tuberkuliny bydlęcej.

Materiał i metody

Sporządzenie tuberkuliny PPD bydlęcej. Szczep *Myc. bovis* AN₅ otrzymano z C.V.L. Weybridge. Szczep

ten, przetrzymywany w stanie zliofilizowanym, zregenerowano na podłożu Lowensteina-Jensena, a następnie przesiano na podłoże ziemniaczane Watson-Reida. Po uzyskaniu wzrostu na powierzchni tego podłoża, kawałki błonki stanowiącej hodowlę prątków przenoszono do 300 ml flaszek z bulionem. Dalej postępowano zgodnie z technologią produkcji tuberkuliny PPD ssaków (1).

W uzyskanym koncentracie tuberkuliny bydlęcej zawartość białka tuberkulinowego określano metodą micro-Kjeldahla, po czym rozcieńczono koncentrat buforem fosforanowym w takim stopniu, aby tuberkulina *ad usum* zawierała 0,5 mg PPD/ml. Zarówno tuberkulinę skoncentrowaną, jak i rozcieńczoną *ad usum* badano na jałowość, nieszkodliwość oraz aktywność biologiczną (na świnkach morskich sztucznie uczulonych *Myc. bovis* AN₅) według metod obowiązujących przy kontroli i standaryzacji tuberkuliny PPD ssaków (7). Standard roboczy tuberkuliny PPD bydlęcej do badań porównawczych otrzymano z C.V.L. Weybridge.

Próby na bydło. Badania przeprowadzono łącznie na 3203 sztukach bydła. Próby wykonywano w sposób następujący: z lewej strony szyi każdego zwierzęcia robiono rutynowy test porównawczy, wstrzykując śródskórnie po 0,2 ml tuberkuliny ssaków i ptasiej. Po prawej stronie szyi, w miejscu analogicznym do miejsca wprowadzenia tuberkuliny ssaków wstrzykiwano 0,2 ml tuberkuliny bydlęcej. Tak więc stosowano równocześnie 3 tuberkuliny, przy czym uzyskane reakcje na tuberkulinę ptasią wykorzystywano w dwóch testach porównawczych. Po 72 godz. odczytywano wyniki określając charakter powstałych odczynów i dokonując pomiarów według obowiązujących zasad. Wyniki tuberkulinizacji pojedynczej i porównawczej w wykonaniu rutynowym oceniano zgodnie z obowiązującym w naszym kraju „kluczem”. Natomiast wyniki podobnych testów z użyciem tuberkuliny bydlęcej interpretowano według zmodyfikowanego „klucza” wzorowanego na zasadach „klucza” angielskiego dla tuberkuliny bydlęcej (tab. 1). Zastosowanie 2 różnych „kluczy” było konieczne, gdyż tuberkulinę ssaków stosuje się w dawce 10 000 j., bydlęcą — 7500 j.; a ptasią 2500 j. Tak więc w teście porównawczym stosunek dawki tuberkuliny ssaków do ptasiej wynosi 4:1, a bydlęcej do ptasiej 3:1. Oceniano wyniki uzyskiwane zarówno w próbie pojedynczej z użyciem tuberkuliny ssaków i bydlęcej, jak i w próbie porównawczej. 71 wybranych zwierząt poddano ubojowi i sekcji. Do uboju diagnostycznego kierowano przede wszystkim te zwierzęta, u których uzyskano niezgodne wyniki w stosowanych testach porównawczych. W przypadkach wątpliwych przeprowadzono badania mikrobiologiczne w celu wyizolowania i określenia typu prątka wywołującego uczulenie bydła.

Wyniki i omówienie

Ze szczepu *Myc. bovis* AN₅ sporządzono 2 serie próbne tuberkuliny bydlęcej. Seria I wynosiła 2,5 litra koncentratu o zawartości 6,9 mg PPD/ml., seria II — 6 litrów koncentratu, a zawartość PPD — 6,8 mg/ml.

Ilość białka tuberkulinowego uzyskanego ze szczepu *Myc. bovis* AN₅ była w przybliżeniu

Tab. 1. Klucz do oceny wyników tuberkulinizacji z użyciem tuberkuliny bydłowej

Test pojedynczy

Charakter odczynu	Ocena
Różnica zgrubienia fałdu skóry przed i po iniekcji tuberkuliny 3 mm lub więcej bez względu na konsystencję odczynu	+
Odczyn w postaci nacieku rozlanego bez względu na wynik pomiaru	+
Brak odczynu lub ograniczony twardy obrzęk do 3 mm	-

Test porównawczy

Odczyn tuberkulinowy	Wersja I postępowanie zwykle	Wersja II** postępowanie zaostrzone
B(+), P(-)* B(+) > P(+) ponad 4,0 mm	(+) Eliminować	(+) Eliminować
B(+) > P(+) 2,1-4,0 mm	(±) Badać ponownie	(+) Eliminować
B(+) > P(+) 0,1-2,0 mm	(±) Badać ponownie	(±) Badać ponownie
B(+) = P(+) B(+) < P(+) 0,1-2,0 mm	(-) Nie badać ponownie	(±) Badać ponownie
B(+) < P(+) ponad 2,0 mm	(-) Nie badać ponownie	(-) Nie badać ponownie

Objaśnienia: * B(+) — odczyn na tuberkulinę bydłową dodatni, P(-) — odczyn na tuberkulinę ptaszą ujemny; ** Wersję II — stosuje się gdy wyniki badań tuberkulinowych nie budzą wątpliwości co do istnienia zakażenia swoistego w stadzie, lub też gdy gruźlicę stwierdzono badaniem poubojowym.

o połowę mniejsza, niż uzyskuje się go ze szczepów *Myc. tuberculosis* C, DT, PN. Jednakże z uwagi na większą aktywność PPD *Myc. bovis* AN₅, niż PPD *Myc. tuberculosis* (u zwierząt zakażonych *Myc. bovis*) i zmniejszenie w tuberkulinie bydłowej *ad usum* zawartości białka o połowę (do 0,5 mg/ml), z 1 litra koncentratu uzyskiwano w efekcie podobną ilość tuberkuliny bydłowej, jak w przypadku tuberkuliny ssaków. Aktywność biologiczna sporządzonej tuberkuliny bydłowej, określana na sztucznie uczulonych świnkach morskich była podobna do aktywności standardu tuberkuliny PPD bydłowej Weybridge. 1 ml przygotowanej *ad usum* tuberkuliny bydłowej (obu serii) zawierał 37 000 j.t., a dawka diagnostyczna (0,2 ml.) — 7500 j.t.

Wartość diagnostyczną nowej tuberkuliny w porównaniu do tuberkuliny ssaków zbadano łącznie na 3203 sztukach bydła pochodzącego z 17 obór o różnej sytuacji epizootologicznej dotyczącej gruźlicy. Wyniki tych badań zestawiono w tab. 2. Wskazują one, że w oborach wolnych od gruźlicy (I—A i B) stwierdzono 48 zwierząt reagujących na tuberkulinę ssaków, a tylko 9 reagowało na tuberkulinę bydłową. W 12 przypadkach stwierdzono reakcje tylko na tuberkulinę ssaków, a w jednym tylko na tuberkulinę bydłową, przy braku reakcji na inne preparaty. Wynik testu porównawczego z użyciem tuberkuliny ssaków był u 17 zwierząt wątpliwy, a podobny test z użyciem tuberkuliny bydłowej dał dwa wyniki dodatnie i dwa wątpliwe. Średnia wielkość odczynów na tuberkulinę ssaków była znacznie większa (3,7 i 5,2 mm), niż na tuberkulinę bydłową (1,2 i 2,6).

Można więc powiedzieć, że w stadach bydła wolnego od gruźlicy znacznie mniej zwierząt reaguje na tuberkulinę bydłową, niż na ssaków. Test porównawczy z użyciem tuberkuliny bydłowej daje mniej wyników wątpliwych, niż podobny test z użyciem tuberkuliny ssaków. Tym niemniej w dwóch przypadkach test po-

Tab. 2. Wyniki badań porównawczych z użyciem tuberkuliny ssaków (ss), bydłowej (AN₅) oraz ptasiej (pt) 3203 sztuk bydła ze stad o różnej sytuacji epizootologicznej

Oznaczenie stada	Liczba stada	Liczba zwierząt badanych	Liczba zwierząt reagujących									Wynik porównawczego testu tuberkulinowego				Średnia wielkość reakcji (w mm) na tuberkulinę		
			Łącznie			Na poszczególne tuberkuliny:			Tylko na tuberkulinę:			z użyciem tuberkuliny ssaków		z użyciem tuberkuliny AN ₅				
			Liczba	%	ss	pt	AN ₅	ss	pt	AN ₅	+	±	+	±	ss	pt	AN ₅	
I	A	2	208	69 (33,1)	44	54	5	12	21	1	0	13	2	2	3,7	4,0	1,2	
	B	2	407	10 (2,5)	4	6	4	0	2	0	0	4	0	0	5,2	6,6	2,6	
II	A	8	1084	566 (52,2)	448	392	381	22	67	21	301	136	295	64	8,6	4,5	8,0	
	B	5	1704	213 (12,5)	110	157	51	14	101	17	24	100	29	22	3,7	4,4	2,9	

Objaśnienia: I — A — stada wolne od gruźlicy o dużym nasileniu nieswoistych uczuleń na tuberkulinę, I — B — stada wolne od gruźlicy o małym nasileniu uczuleń na tuberkulinę, II — A — stada zakażone prątkiem bydłowym, II — B — stada, w których we wcześniejszych badaniach stwierdzono zwierzęta zakażone *Myc. bovis*.

równawczy z użyciem tuberkuliny bydłowej oceniany według zmodyfikowanego klucza dał wynik dodatni, podczas gdy w rutynowym badaniu uzyskano u tych zwierząt wynik wątpliwy. Wyniki uzyskane w stadach wolnych od gruźlicy pokrywają się na ogół z wynikami innych autorów (3—6, 8), którzy stwierdzili, że tuberkulina bydłowa wywołuje u zwierząt nieswoiście uczulonych mniej krzyżowych reakcji niż tuberkulina produkowana z prątków typu ludzkiego.

Badania przeprowadzone na bydło ze stad zakaźnych *Myc. bovis* wykazały także pewne różnice w wynikach testu tuberkulinowego z użyciem tuberkuliny ssaków i bydłowej (tab. 2;

falszywie ujemnych wyników, niż podobny test z tuberkuliną bydłową.

U jednej spośród trzech krów nie reagujących na żadną tuberkulinę, skierowanych na ubój z innych, niż gruźlica przyczyn, stwierdzono rozległe zmiany gruźlicze. Krowa ta była w stanie anergii.

Wnioski

1. Wydajność PPD ze szczepu *Myc. bovis* AN₅ uzyskana w 2 seriach doświadczalnych tuberkuliny, umożliwia produkcję tego preparatu na skalę przemysłową.

Tab. 3. Porównanie wyników uzyskanych w 2 testach tuberkulinowych z wynikami badań poubojowych 71 sztuk bydła

	Liczba zwierząt reagujących w porównawczych testach:									Razem
	ss + AN ₅ +	ss + AN ₅ ±	ss + AN ₅ -	ss ± AN ₅ +	ss ± AN ₅ ±	ss ± AN ₅ -	ss - AN ₅ +	ss - AN ₅ ±	ss - AN ₅ -	
Badania post-mortem	21	3	2	4	15	8	14	1	3	71
Badanie sekcyjne	wynik dodatni	18	3	0	4	13	1	10	1	51
	wynik ujemny	3	0	2	0	2	7	4	0	20
Badanie bakteriologiczne prób ujemnych sekcyjnie	wynik dodatni	3	0	0	0	1	0	3	1	8
	wynik ujemny	0	0	2	0	1	7	1	0	12

Objaśnienia: ss — obowiązujący test porównawczy z użyciem tuberkuliny ssaków, AN₅ — test porównawczy z użyciem tuberkuliny bydłowej.

II-A i B). Poprawność wyników uzyskanych w obu porównawczych testach tuberkulinowych najlepiej odzwierciedla badanie poubojowe. Jak wynika z tab. 3, spośród 21 zwierząt, u których oba testy porównawcze dały zgodne wyniki dodatnie, we wszystkich przypadkach wykazano gruźlicę badaniem sekcyjnym lub laboratoryjnym. Gruźlicę wykazano także u 14 spośród 15 zwierząt reagujących wątpliwie w obu porównawczych testach. W pozostałych przypadkach stwierdzono mniejsze lub większe niezgodności między wynikami badań alergicznych z użyciem tuberkuliny ssaków i bydłowej.

Na uwagę zasługuje stosunkowo duża liczba — 14 zwierząt gruźliczych (w 13 przypadkach potwierdzono zakażenie *M. bovis*), u których test porównawczy w wykonaniu rutynowym dał wynik ujemny, a test z użyciem tuberkuliny bydłowej — dodatni. U znacznej większości zwierząt tej grupy uczulenie tuberkulinowe było słabe, niekiedy na progu anergii. Czasem nacisk w miejscu iniekcji tuberkuliny bydłowej decydował o zakwalifikowaniu wyniku jako dodatniego. Większa swoistość tuberkuliny bydłowej, niż ssaków mogła też mieć wpływ na obniżenie reakcji na ten ostatni preparat.

O'Reilly i MacClancy (8) przeprowadzając podobne badania na bydło gruźliczym wykazali, że test porównawczy z użyciem tuberkuliny ssaków (human), dawał znacznie więcej

2. Tuberkulina sporządzona ze szczepu *Myc. bovis* AN₅ wykazała, w warunkach przeprowadzonych doświadczeń, większą wartość diagnostyczną, niż tuberkulina ssaków, zarówno w stadach bydła nieswoiście uczulonego na tuberkulinę, jak i w stadach zakażonych prątkiem bydłowym.

3. Tuberkulina bydłowa produkcji krajowej oraz zmodyfikowany klucz do interpretacji wyników pojedynczego i porównawczego testu tuberkulinowego wymagają oceny na większym materiale terenowym.

Piśmiennictwo

1. Brill J., Polityńska E.: Tuberkulina PPD. PWRIL, 1960.
2. Lesslie I. W.: J. biol. stand. 4, 39, 1976.
3. Lesslie I. W., Hebert C. N.: Vet. Rec. 96, 338, 1975.
4. Lesslie I. W., Hebert C. N., Barnet D. N.: Vet. Rec. 96, 335, 1975.
5. Lesslie I. W., Hebert C. N., Burn K. J., MacClancy B. N., Donnelly W. J.: Vet. Rec. 96, 332, 1975.
6. Lesslie I. W., Hebert C. N., Frerichs G. N.: Vet. Rec. 98, 170, 1976.
7. Metody kontroli tuberkuliny PPD ssaków. Inst. Wet., 1970.
8. O'Reilly L. M., MacClancy B. N.: I. vet. J. 29, 63, 1975.

Adres autora: prof. dr Cezariusz Zórawski, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy.

Журавский С., Карпинский Т., Висьневский З. — Исследования туберкулина PPD крупного рогатого скота, изготовленного из штамма *Myc. bovis* AN₅.

Изготовили 2 испытательные серии туберкулина крупного рогатого скота. Содержание PPD в сконцентрированном туберкулине составляло 6,8 мг/мл., а в препарате ad usum 0,5 мг/мл. Диагностическая доза 0,2 мл соответствовала 7500 е.т. Исследования,

проведенные на 3203 головах скота из туберкулезных и неспецифически сенсибилизированных стад показали, что туберкулин из штамма *Myc. bovis AN₅* обладает большей ценностью для распознавания туберкулезозоонозного рогаемого скота чем туберкулин млекопитающих, производимый из штаммов *Myc. tuberculosis C, DT и PN*.

Zórawski C., Karpiński T., Wiśniewski Z. — A study on the bovine PPD tuberculin prepared from *Myc. bovis AN₅*.

Two experimental batches of bovine tuberculin were prepared. The concentrated tuberculin contained 6.8 mg PPD per ml. and the diluted tuberculin, ready for use, had 0.5 mg PPD per ml. A diagnostic dose (0.2 ml) of the tuberculin was equal to 7500 i.u. The preparation was tested on 3203 cattle originating from tuberculous and non specifically sensitized herds. The results indicated that bovine tuberculin prepared from *Myc. bovis AN₅* had better diagnostic value than mammalian tuberculin prepared from *Myc. tuberculosis C, DT, PN*.

MICHAŁ RYMARCZUK

Odczyny na tuberkulinę ssaków, ptasią oraz sensytnę homologiczną u bydła zakażonego prątkami fotochromogennymi

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR we Wrocławiu

Rola prątów atypowych w patologii weterynaryjnej jest obecnie przedmiotem wszechstronnych badań. Dane piśmiennictwa wskazują, że drobnoustroje te są szeroko rozprzestrzenione w przyrodzie i często stanowią czynnik etiologiczny zmian gruźliczopodobnych, stwierdzanych u świń i innych zwierząt (2, 4, 9, 10, 12). Zakażenie zwierząt prątkami atypowymi wywołuje zwykle stan uczulenia tuberkulinowego, co w znacznym stopniu może utrudnić alergiczne rozpoznawanie gruźlicy. Nyiredy i wsp. (3), Sudaczenkow (7) oraz Akułow (1) wykazali, że cielęta sztucznie zakażone różnymi prątkami atypowymi mogą reagować zarówno na tuberkulinę ptasią, jak i ssaków. Podobne wyniki uzyskał Sobiech i wsp. (5, 6) przeprowadzając badania na bydle dorosłym. Zórawski i wsp. (11) stwierdzili doświadczalnie wpływ zakażenia prątkami reprezentującymi I—IV grupę Runyona na występowanie alergii tuberkulinowej u trzody chlewnej.

W dostępnym piśmiennictwie brak jest informacji dotyczących wpływu zakażenia bydła prątkami fotochromogennymi (grupa I Runyona) na wynik tuberkulinizacji porównawczej. Z badań Takeya i wsp. (8) przeprowadzonych na świnkach morskich wynika, że prątki fotochromogenne posiadają podobne właściwości uczulające jak *Myc. tuberculosis*. Celem niniejszej pracy było zbadanie stanu uczulenia na tuberkulinę ssaków i ptasią oraz sensytnę homologiczną u bydła sztucznie zakażonego prątkami fotochromogennymi.

Materiał i metody

Szczepy. Do badań użyto dwa szczepy prątów fotochromogennych — *Mycobacterium balnei* oraz *Mycobacterium P*, które otrzymano z Instytutu Gruźlicy w Warszawie. Testy alergiczne wykonywano przy użyciu tuberkuliny PPD ssaków i ptasiej produkcji krajowej stosując dawki zalecane w rutynowych badaniach bydła na gruźlicę. Ponadto użyto sensytny PPD sporządzone z obu wymienionych szczepów prątów fotochromogennych. Sensytny wyprodukowane

w Puławskich Zakładach „Biowet” zawierały, podobnie jak tuberkulina ptasia, 0,25 mg PPD w 1 ml preparatu. Dawka diagnostyczna wynosiła 0,2 ml.

Zakażenie i badanie zwierząt doświadczalnych. Badania przeprowadzono łącznie na 141 cielętach rasy ncb w wieku 6—8 mies., które podzielono na 6 grup.

Grupa A — 40 zwierząt, otrzymała jednorazowo *per os* zawiesinę *Myc. balnei* w ilości 5 mg wilgotnej masy prątków na 1 kg ciężaru ciała.

Grupa B — 10 cieląt zakażono podskórnie zawiesiną *Myc. balnei* w ilości 2 mg/kg c.c.

Grupa C — 21 zwierzętom podano *per os* prątki szczepów P1 w takiej samej ilości, jak grupie A.

Grupę D — 8 cieląt zakażono podskórnie prątkami szczepu P1 — w takiej samej ilości, jak cielętom grupy B.

39 cieląt grupy E oraz 23 — grupy F pozostawiono niezakażone — stanowiły one kontrolę dla grupy A-B i C-D. Po upływie 1, 3, 5 i 7 miesięcy od chwili zakażenia przeprowadzono testy alergiczne, stosując u wszystkich zwierząt doświadczalnych tuberkulinę ssaków i ptasią oraz odpowiednio sensytny jak przedstawiono w tab. 1. Stopień uczulenia na sensytnę oceniano według kryteriów stosowanych w próbie tuberkulinowej.

Wyniki i omówienie

Dla przejrzystości w analizie wyników uwzględniono tylko reakcje dodatnie na stosowane preparaty alergiczne pomijając odczyny wątpliwe.

W tab. 1 zestawiono wyniki badań alergicznych cieląt, jakie otrzymano w poszczególnych grupach doświadczalnych w 1, 3, 5 i 7 miesiącu po zakażeniu. W tabeli tej podano odsetek zwierząt reagujących dodatnio oraz średnią różnicę grubości fałdu skóry (rgfs) dla całej grupy badanej w 72 godziny po tuberkulinizacji. Użyte dane świadczą, że zawiesina *Myc. balnei* podana cielętom doustnie wywołała uczulenie na sensytnę homologiczną stwierdzone w 1 mies. po zakażeniu u 52,5% cieląt, a średnia rgfs dla tej grupy wynosiła 3,5 mm. W badaniu wykonanym 3 i 5 mies. po zakażeniu odsetek