

УДК 619:614.48:616:579.873.21

КАССИЧ В.Ю., д-р вет. наук, професор

РЕБЕНКО Г.І., канд. вет. наук

Сумський національний аграрний університет

СКРИПНИК В.Г., д-р. вет. наук

УШКАЛОВ В.О., д-р вет. наук, професор, чл.-кор. НААН України

СКРИПНИК А.В., канд. вет. наук

Державний науково-контрольний інститут біології та штамів мікроорганізмів

ЗАМАЗІЙ А.А., д-р вет. наук

Полтавська державна аграрна академія

ПРОТЕІНОГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ ВИРОБНИЧИХ ШТАМІВ *M. BOVIS* «VALLE» ТА «AN-5»

У статті стверджується, що у відповідності зі стандартом ЄС, PPD-туберкулін для ссавців слід виготовляти зі штамів *M. bovis* «AN-5» або «Valle», тоді як під час виготовлення туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців в стандартному розчині (ТУУ 24.00497087.645-2001) виробничим штамом є *M. bovis* ІЕКВМ-1. Тому розробка вітчизняних сухих очищених PPD-туберкулінів зі штамів *M. bovis* «AN-5» та «Valle» є актуальним завданням.

Ключові слова: туберкульоз, туберкулін, мікобактерії *M. bovis* «Valle» та «AN-5».

Постановка проблеми. Ефективна боротьба з туберкульозом тварин можлива лише у разі всебічного вивчення біології збудника, епізоотології, патогенезу, методів профілактики, економічних і екологічних факторів, які впливають на перебіг хвороби за умов забезпечення тваринництва ефективними засобами специфічної діагностики. Основним методом прижиттєвих досліджень тварин на туберкульоз є алергічне дослідження із застосуванням ППД-туберкуліну для ссавців [1–3]. Препарати для алергічної діагностики туберкульозу тварин і птиці «Туберкулін очищений (ППД) для ссавців в стандартному розчині» (ТУУ 24.00497087.645-2001), ППД-туберкулін для птиці (ТУУ 24.4.00497087-675-2002) та алерген з атипових мікобактерій (ААМ) (ТУУ 24.400497087-697-2003) розроблені в ННЦ ІЕКВМ колективом авторів (Кассіч Ю.Я., Загородній А.І., Кассіч В.Ю. та ін.) [3–5], впроваджені у виробництво, виготовляються Сумською біологічною фабрикою і забезпечують проведення планових діагностичних досліджень на туберкульоз на території України [6, 7].

Проте слід враховувати, що за ведення торгівлі тваринами між країнами Європейського співтовариства законодавчим актом є Директива Ради ЄС за номером 97/12/ЄС від 17 березня 1997 р., яка вносить зміни і модернізує Директиву № 64/432/ЄС [8]. У відповідності з цими документами туберкулінізацію тварин проводять з використанням туберкулінів PPD (*Protein purified derivative*) або HCSM (*Heat-concentrated synthetic-medium tuberculin*). Згідно зі стандартом ЄС, що надає *Institute voor Dierhouderij en Diergezondheid (ID-DLO), Lelystad, The Netherlands*, PPD-туберкулін для ссавців повинен мати ефективність 50 000 ЕСТ/мл та виготовлятися зі штамів *M. bovis* «AN-5» або «Valle» [8], тоді як за виготовлення туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців в стандартному розчині ТУУ 24.00497087.645-2001, виробничим штамом є *M. bovis* ІЕКВМ-1 [3, 5, 8]. Тому розробка вітчизняного сухого очищеного PPD-туберкуліну зі штамів *M. bovis* «AN-5» або «Valle» є актуальним завданням [5, 8].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Для прижиттєвої діагностики туберкульозу ссавців і птахів застосовують сухі очищені (ППД) туберкулін для ссавців і птахів та алергени з атипових мікобактерій (КАМ, ААМ). Туберкулін сухий очищений (ППД) – це дериват протеїну мікобактерій (*Purified Protein Derivatив – PPD*) – фрагмент молекули туберкулопротеїна.

У колишньому СРСР туберкуліни типу ППД були виготовлені для застосування в медицині [4] та для ссавців [5] і птиці [9]. На думку вчених [10, 11], речовина, яка зумовлює алергічну відповідь, є продуктом гідролізу молекули туберкулопротеїна, тобто її похідним (дериватом). Упродовж тривалого часу туберкулін виготовляли з трьох штамів збудника туберкульозу бичачого та двох –

людського виду. У зв'язку з більшою специфічністю і активністю моноалергенів нині у разі виготовлення туберкуліну для ссавців використовують штами лише одного бичачого виду [2].

Мета дослідження – вивчення протейногенних властивостей виробничих штамів *M. bovis* «Valle» (модифікатор КСП) та «AN-5» для подальшого створення на їх базі вітчизняних препаратів для алергічної діагностики туберкульозу тварин, що відповідають вимогам ЄС, оскільки основою ветеринарних біологічних імунопрепаратів є виробничі штами.

Матеріали і методи досліджень. Дослідні серії туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців у стандартному розчині готували з культурального фільтрату збудника туберкульозу бичачого виду виробничих штамів *M. bovis* Valle-КСП та «AN-5», вирощених на рідкому синтетичному живильному середовищі Сотона стерилізацією культур автоклавуванням (100 °C, 3 год), відокремленням бактеріальної маси, одержанням й стерилізацією культуральних фільтратів (стерилізуюча фільтрація), осадженням протейну розчином трихлороцтової кислоти, переосадженням його насиченим розчином амонію сульфату, очищенням від солей за допомогою діалізу з подальшим визначенням концентрації протейну в 1 см³ розчину.

Визначення масової частки білка у стандартному розчині туберкуліну проводили за методом К'ельдаля. Для цього використовували наступні прилади та реактиви: колбу К'ельдаля ємністю 50 або 100 см³ за ГОСТ 25336; прилад перегінний К'ельдаля; холодильник; шафу сушильну з температурою нагрівання до 110 °C; ваги лабораторні не нижче 2-го класу точності; елемент нагрівання (електроплитка) за ГОСТ 14919; піпетки градуйовані за ГОСТ 29228; бюретки за ГОСТ 29252; колби Ерлеймейера ємністю 2–5 см³; крапельницю; папір лакмусовий; фільтри паперові знезолені; кислоту сульфатну за ГОСТ 4204 концентровану, щільністю 1,84 г/см³ і розчин 0,05 моль/дм³; натрію гідроксид за ГОСТ 4328, розчин з масовою часткою від 30 до 33% і розчин 0,1 моль/дм³, виготовлений на кип'яченій дистильованій воді; пероксид гідрогену за ГОСТ 10929; метиловий червоний, розчин з масовою часткою 0,2 %; метиленовий синій, розчин з масовою часткою 0,1 %; спирт етиловий ректифікований за ГОСТ 5962, розчин з масовою часткою 70 %; метиловий рожевий, розчин з масовою часткою 0,1 %; кислоту трихлороцтову, розчин з масовою часткою 5 та 10 %; воду дистильовану за ГОСТ 6709.

Результати дослідження та їх обговорення. Випробування проводили наступним чином. У пробірки вносили по 2 см³ стандартного розчину туберкуліну: в першу – туберкулін серії, виготовленої з виробничого штаму *M. bovis* Valle-КСП, у другу – виготовленої з виробничого штаму «AN-5». У пробірки з 2 см³ 10 % розчину туберкулінів вносили по 2 см³ розчину трихлороцтової кислоти і залишали у холодильнику на 30 хв за температури від 4 до 6 °C для коагуляції білка. Потім фільтрували через знезолений фільтр, змиваючи залишки білка із пробірки розчином трихлороцтової кислоти з масовою часткою 5 %. Білок на фільтрі тричі промивали розчином трихлороцтової кислоти з масовою часткою 15 % для вилучення залишкового нітрогену (азоту). Фільтри з білком туберкулінів серій, виготовлених з виробничих штамів *M. bovis* Valle-КСП та «AN-5», висувували на повітрі, потім розміщували у двох колбах К'ельдаля, додавали по 2 см³ концентрованої сірчанної кислоти й мінералізували нагріванням.

Мінералізацію проводили у присутності каталізатора – пероксиду гідрогену, який додавали по 0,5 см³ через кожні 15–20 хв до повного знебарвлення розчину.

Після охолодження вміст колб К'ельдаля переносили у колби для відгону, залишки розчину змивали порціями дистильованої води загальним об'ємом 10–12 см³. Вичерпаність перенесення перевіряли індикатором метиловим рожевим до одержання рожевого кольору в останній пробі води.

У 2 колби Ерлеймейера наливали по 20 см³ розчину сульфатної кислоти 0,05 моль/дм³ і 10–15 крапель індикатора Таширо. Індикатор Таширо готували змішуванням у рівних об'ємах спиртового розчину метиленового червоного з масовою часткою 0,2 % і спиртового розчину метиленового синього з масовою часткою 0,1 %.

Відгінні колби з'єднували з холодильником та пароутворювачем. Вміст колб нейтралізували розчином натрію гідроксиду з масовою часткою від 30 до 33 % за індикатором метиловим рожевим. Потім вміст відганяли. Відгін аміаку проводили до тих пір, поки в приймальних колбах накопичувалось по 20 см³ розчину. Завершення відгону перевіряли лакмусовим папером.

Уміст приймальних колб титрували розчином натрію гідроксиду 0,1 моль/дм³ до зміни забарвлення розчину від лілового до зеленого (індикатор Таширо). Одночасно визначали масову частку нітрогену в знезоленому фільтрі.

Масову концентрацію білка, мг/см³, у пробах туберкуліну серії, виготовленої з виробничого штаму *M. bovis* «Valle» (модифікатор КСП), та серії, виготовленої з виробничого штаму *M. bovis* «AN-5» (X_1 та X_2), обчислювали за формулою (1):

$$X_1 \text{ та } X_2 = \frac{(VK - V_1K_1) - (V_2K - V_3K)1,4}{2} \times 6,25, \quad (1)$$

де V – об'єм 0,1 моль/дм³ розчину сульфатної кислоти, що налитий у приймальну колбу за аналізу проби, см³;

K – поправковий коефіцієнт до титру 0,1 моль/дм³ розчину сульфатної кислоти;

V_1 – об'єм 0,1 моль/дм³ розчину натрію гідроксиду, витрачений на титрування проби, см³;

K_1 – поправковий коефіцієнт до титру 0,1 моль/дм³ розчину натрію гідроксиду;

V_2 – об'єм 0,1 моль/дм³ розчину кислоти сульфатної, налитий у приймальну колбу за аналізу проби, см³;

V_3 – об'єм 0,1 моль/дм³ розчину кислоти сульфатної, витрачений на титрування проби за аналізу незроленого фільтру, см³;

1,4 – маса нітрогену, що відповідає 1 см³ 0,1 моль/дм³ розчину сульфатної кислоти, мг.

Згідно з існуючими вимогами [5, 6], масова частка білка у туберкуліні має бути 0,8±0,2 мг/см³. Масова частка білка у туберкуліні серії (X_1), виготовленої з виробничого штаму *M. bovis* «Valle» (модифікатор КСП), становила 0,86±0,07 мг/см³, а в туберкуліні серії (X_2), виготовленої з виробничого штаму *M. bovis* «AN-5» – 0,87±0,10 мг/см³.

Висновки і перспективи подальших досліджень. Результати проведених досліджень свідчать, що штами *M. bovis* «Valle» та «AN-5» є високопротеїногенними і перспективними у виробництві ППД-туберкуліну для ссавців.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Туберкулез сельскохозяйственных животных / [Колычев А.М., Кассич Ю.Я., Мартма О.В и др]; Под ред. В.П. Шишкова и В.П. Урбана. – М.: ВО «Агропромиздат», 1991. – 255 с.
2. Туберкулез животных и меры борьбы с ним / [Кассич Ю.Я., Борзяк А.Т., Кочмарский А.Ф. и др.]; Под ред. Ю.Я. Кассича. – К.: Урожай, 1990. – 304 с.
3. Кассич В.Ю. Мінливість мікобактерій, епізоотологічний моніторинг, засоби і заходи боротьби з туберкульозом тварин в умовах радіаційного впливу: дис. на здобуття наук. ступеня д-ра вет. наук: спец. 16.00.03 / В.Ю. Кассич. – Харків, 2004. – 408 с.
4. Високоєфективний вітчизняний туберкулін / Ю.Я. Кассич, В.Ю. Кассич, П.М. Тихонов, В.М. Горжеев // Аграрна наука – виробництву. – 2005. – № 1. – С. 26–27.
5. Аллергия и аллергическая диагностика инфекционных болезней / В.Ю. Кассич, Н.П. Овдиенко, Е.В. Волосянко, Т.Г. Нестеренко. // Сучасні проблеми біотехнології, стандартизації та забезпечення контролю якості вет.препаратів, кормів та кормових добавок: Зб. статей міжнар. наук.-практ конф., присвяченої 10-річчю ДНКІБШМ // Вет. біотехнологія. – Бюл. №13 (2). – 2008. – С. 123–128.
6. Туберкулін очищений (ППД) для ссавців у стандартному розчині / ТУ У 24.4.00497087-645-2001.
7. Туберкулін очищений (ППД) для птиці у стандартному розчині. ТУ У 24.4.00497087-675-2002.
8. Контроль худоби на наявність туберкульозу в країнах-членах ЄС/ Ю.О. Колос, В.І. Хоменко, В.Ф. Титаренко, О.М. Клименко // Епізоотологія і профілактика інфекційних хвороб великої рогатої худоби: Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. (14–17 березня 2006 р., НАУ, Київ, Україна). – К., 2006 – С. 42–43.
9. Безгин В.М. Совершенствование промышленной технологии (ППД) туберкулина и его биохимическая характеристика: автореф. дис. на соискание уч. степени канд. вет. наук: спец. 03.00.04 / В.М. Безгин – М., 1990. – 27 с.
10. Патент Российской Федерации. RU (11) 2035924. – (51) 6 А 61 К 39 / 04. Способ получения туберкулина / [Шевырев Н.С., Безгин В.М., Ничеева Л.Д., Солодов Е.Н., Козлов В.Е., Гринев А.А., Сорокина А.А., Алехин В.А., Шаров А.Н., Тырина В.С., Букова Н.К.]. – (21) 93003234 / 13. – (46) 27.05.95. – Бюл. № 15.
11. Патент Российской Федерации. (19) RU. – (11).2031656 (51) 6 А 61 К 39/04. Способ получения туберкулина / [Конарев А.А., Агаджанова Л.В., Помогаева Л.С., Безгин В.М., Шевырев Н.С., Ничеева Л.Д., Солодов Е.Н., Козлов В.Е.]. – (21) 5049029/13. – (46) 27.03.95. – Бюл. № 9.

Протеиногенные свойства производственных штаммов *M. bovis* «Valle» и «AN-5»

В.Ю. Кассич, Г.И. Ребенко, В.А. Ушкалов, В.Г. Скрипник, А.В. Скрипник, А.А. Замазий

В статье показано, что в соответствии со стандартом ЕС РРД-туберкулин для млекопитающих должен изготавливаться из штаммов *M. bovis* «AN-5» или «Valle», в то время как при производстве туберкулина очищенного (ППД) для млекопитающих в стандартном растворе ТУУ 24.00497087.645-2001, основным производственным штаммом является

M. bovis ІЕКВМ-1. Поэтому разработка сухих очищенных РРД-туберкулинов из штаммов *M. bovis* «AN-5» и «Valle» является для Украины актуальной.

Ключевые слова: туберкулез, туберкулин, микобактерии *M. bovis* «Valle» и «AN-5».

Надійшла 17.10.2013.