

УДК 619:614.48:616:579.873.21

ПРОТЕІНОГЕНІЗІ ВЛАСТИВОСТІ ВИРОБНИЧИХ ШТАМІВ

M.bovis Valle TaAN-5

В.Ю. КАСПІЧ, доктор ветеринарних наук, професор,

Г.І. Ребенко, кандидат ветеринарних наук, доцент,

Сумський національний аграрний університет

В.О. УШКАЛОВ, доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент НААН України,

В.Г. СКРИПНИК, доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник,

А.В. СКРИПНИК, кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник,

ДНКІБШМ

А.А.ЗАМАЗІЙ, доктор ветеринарних наук, доцент.

Полтавський ДСГУ

У відповідності із стандартом ЕС PPD-туберкулін для ссавців повинен виготовлятися зі штамів M.bovis «AN5» або «Valle», в той час як при виготовленні «Туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців в стандартному розчині» (ТУУ 24.00497087.645-2001), виробничим штамом є «M.bovis IEKBM-1». Тому розробка вітчизняних сухих очищених PPD-туберкулінів із штамів M.bovis «AN5» та «Valle» є актуальним завданням.

Ключові слова: туберкульоз, туберкулін, мікобактерії M.bovis Valle та AN5.

Постановка проблеми у загальному вигляді та аналіз досліджень і публікацій. Ефективна боротьба з туберкульозом тварин можлива лише при всебічному вивченні 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. 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., Завгородній А.І., Кассіч В.Ю. та ін.) [3,6,7], впроваджені у виробництво, виготовляються Сумською біологічною фабрикою і забезпечують проведення планових діагностичних досліджень на туберкульоз на території України [3, 6, 7].

Проте слід враховувати, що при веденні торгівлі тваринами між країнами Європейського співтовариства законодавчим актом є Директива Ради ЄС за номером 97/12/ЄС від 17 березня 1997р., яка вносить зміни і модернізує Директиву № 64/432/ЄС [12]. У відповідності з цими документами туберкулінізацію тварин проводять з використанням туберкулінів PPD (Protein purified derivative) або HCSM (Heat-concentrated synthetic-medium tuberculin). Згідно стандарту ЕС, що надає Institute voor Dierhouderij en Diergenzondheid (ID-DLO), Lelistad, The Netherlands, PPD-туберкулін для ссавців повинен мати зфективність 50 000 ЕСТ / мл та виготовлятися зі штамів *Mbovis* «AN5» або «Valle» [12], в той час як при виготовленні «Туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців в стандартном» розчині» ТУУ 24.00497087.645-2001, виробничим штамом є «*M.bovis* ІЕКВМ-1» [3, 7, 12]. Тому розробка вітчизняного сухого очищеного PPD-туберкуліну з штамів *M.bovis* «AN5» або «Valle» є актуальним завданням [7,12].

Мета роботи. Основою ветеринарних біологічних імунопрепаратів є виробничі штами. Тому метою нашої роботи було вивчення протейногенних властивостей виробничих штамів *M.bovis* Valle (модифікант КСП) та AN5 для подальшого створення на їх базі вітчизняних препаратів для алергічної діагностики туберкульозу тварин, що відповідають вимогам ЄС.

Матеріали, методи та результати 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 AN5, вирощених на рідкому синтетичному живильному середовищі Сотона шляхом стерилізації культур автоклавуванням (100°C, 3 години), відокремлення бактеріальної маси, одержання й стерилізації

культуральних фільтратів (стерилізуюча фільтрація), осадження протейну розчином трихлороцтової кислоти, переосадження його насиченим розчином сірчаноокислого амонію, очищення 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. При цьому використовували такі прилади та реактиви: колбу К'ельдаля ємністю 50 або 100 см³ за ГОСТ 25336; прилад перегінний К'ельдаля; холодильник; шафу сушильни з температурою нагрівання до 110° С; 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 см; крапельницю; папір лакмусовий; фільтри паперові знезолені; кислоту сірчану за ГОСТ 4204 концентровану, щільністю 1,84 г/см і розчин 0,05 моль/дм³; натрій гідроокис за ГОСТ 4328, розчин з масовою часткою від 30 до 33% і розчин 0,1 моль/дм³, виготовлений на кип'яченій дистильованій воді; перекис водню за ГОСТ 10929; метиловий червоний, розчин з масовою часткою 0,2 %; синьку метиленову, 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.

Випробування проводили таким чином. В пробірки вносили по 2 см стандартного розчину туберкуліну. В першу пробірку вносили туберкулін, серії виготовленої з виробничого штаму M.bovis Valle-КСП, а в другу - туберкулін, серії виготовленої з виробничого штаму AN-5.

В пробірки з 2 см розчину туберкулінів вносили по 2 см розчину трихлороцтової кислоти з масовою часткою 10% і залишали у холодильнику на 30 хвилин при температурі від 4 до 6° С для коагуляції білка. Потім фільтрували через знезолений фільтр, змиваючи залишки білка з пробірки розчином трихлороцтової кислоти з масовою часткою 5%. Білок на фільтрі тричі промивали розчином трихлороцтової кислоти з масовою часткою 15% для вилучення

залишкового азоту. Фільтри з білком туберкулінів серій, виготовлених з виробничих штамів *M.bovis* Valle-КСП та AN-5 висушували на повітрі, потім розміщували у двох колбах К'ельдаля, додавали по 2 см³ концентрованої сірчаної кислоти й мінералізували нагріванням.

Мінералізацію проводили у присутності каталізатора - перекису водню, який додавали по 0,5 см³ через кожні 15-20 хвилин 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 переносу перевіряли індикатором метиловим рожевим до одержання рожевого кольору в останній пробі води.

В 2 колби Ерлеймейера наливали по 20 см розчину сірчаної кислоти 0,05 моль/дм і 10-15 крапель індикатора Таширо. Індикатор Таширо готували шляхом змішування у рівних об'ємах спиртового розчину метиленового червоного з масовою часткою 0,2 % і спиртового розчину метиленової синьки з масовою часткою 0,1%.

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

Вміст приймальних колб титрували розчином гідроокису натру 0,1 моль/дм³ до зміни забарвлення розчину від лілового до зеленого (індикатор Таширо).

Одночасно визначали масову частку азоту в знезоленому фільтрі.

Масову концентрацію білка в мг/см³ у пробах туберкуліну серії, виготовленої з виробничого штаму *M.bovis* Valle (модифіканти КСП) та серії, виготовленої з виробничого штаму *M.bovis* AN-5 (Хі та Хг) обчислюють за формулою (2):

$$X_1 \text{ та } X_2 = \frac{(VK - V_1K_1) - (V_2K - V_3K)1.4}{2} 6.25 \quad (2)$$

де V - об'єм 0,1 моль/дм³ розчину сірчаної кислоти, що налитий у приймальну колбу при аналізі проби, см³;

K - поправочний коефіцієнт до титру 0,1 моль/дм³ розчину сірчаної кислоти;

V_i- об'єм 0,1 моль/дм³ розчину гідроокису натрію, що витрачений на титрування проби, см³;

K_i- поправочний коефіцієнт до титру 0,1 моль/дм³ розчину гідроокису натрію;

V₂- об'єм 0,1 моль/дм³ розчину сірчаної кислоти, що налитий у приймальну колбу при аналізі проби, см³;

V₃- об'єм 0,1 моль/дм³ розчину сірчаної кислоти, що витрачений на титрування проби при аналізі знезоленого фільтру, см³;

1.4 - маса азоту, що відповідає 1 см³ 0,1 моль/дм³ розчину сірчаної кислоти, мг;

Згідно існуючих вимог [15,16], масова частка білка у туберкуліні повинна бути (0,8±0,2)мг/см³. Масова частка білка у туберкуліні серії (X_i), виготовленої з виробничого штаму M.bovis Valle (модифіканти КСП) становила (0,86±0,07)мг/см³, а у туберкуліні серії (X₂), виготовленої з виробничого штаму M.bovis AN-5 - (0,87±0,1)мг/см³.

Висновки і перспективи подальших досліджень. Результати проведених досліджень свідчать, що штами M.bovis Valle та AN5 є високопротеїногенним і перспективними при виробництві ППД-туберкуліну для ссавців.

Список використаних джерел:

1. Туберкулез сельскохозяйственных животных / [Кольчев 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. - Киев: "Урожай", 1990.-304с.

3. Кассіч В.Ю. Мінливість мікобактерій, епізоотологічний моніторинг, засоби і заходи боротьби з туберкульозом тварин в умовах радіаційного впливу: Дис...д-ра.вет.наук: 16.00.03 - Харків, 2004.- 408 с
4. Линникова М.А. Очищенный протеин дериват туберкулина // Проблемы туберкулеза-1939.- №12.- С.3-12.
5. Говоров А.М Новые туберкулины / А.М.Говоров, Ф.И.Осташко. - Науч.-тех. бюллетень УНИИЭВ.- 1956.- С.12-15.
6. Кассіч Ю.Я. Високоєфективний вітчизняний туберкулін / КХЯ.Кассіч, В.Ю Кассіч., П.М.Тихонов, В.М. Горжеев. - Аграрна наука - виробництву.—2005- №1. - С.26-27.
7. Кассіч В.Ю. Аллергия и аллергическая диагностика инфекционных болезней / В.Ю.Кассич, Н.П.Овдиенко., Е.В.Волосьянко, Т.Г.Нестеренко. - Збірник статей міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні проблеми біотехнології, стандартизації та забезпечення контролю якості вет.препаратів, кормів та кормових добавок», присвячена 10-річчю ДНКІБШМ. // Вет.біотехнологія. Бюл.№13 (2). - Київ. - 2008. - С.123-128.
8. Безгин В.М. Совершенствование промышленной технологии (ППД) туберкулина и его биохимическая характеристика.: Автореф. Дис.канд. вет. наук : 03.00.04 - М., 1990. - 27 с.
9. Патент Российской федерации. RU (11)2035924.-(51)6 А 61 К 39/04. Способ получения туберкулина. Шевырев Н.С., Безгин В.М., Ничвеева 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.
10. 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., Ничвеева Л.Д., Солодов Е.Н., Козлов В.Е. - (21) 5049029/13.-(46) 27.03.95.- Бюл. № 9.
11. Лысенко А.П. Антигены *Mycobacterium Bovis* и атипичных микобактерий,изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота: Дис...д-ра.вет.наук: 16.00.03 - Минск, 1994- 379 с.
12. Колос Ю.О.Контроль худоби на наявність туберкульозу в країнах-членах ЄС/ Ю.О.Колос, В.Г.Хоменко, В.Ф.Титаренко, О.М.Клименко. - Матеріали Міжнародної наук.-практ. конференції «Епізоотологія і профілактика інфекційних хвороб великої рогатої худоби», 14-17 березня 2006 року, НАУ, Київ, Україна..- Київ .- 2006..- С 42-43.
13. Красильников Н.О.,1974 по книге: Радчук И.А., Дунаев Г.В., Колычев Н.М.. Ветеринарная микробиология и иммунология. М., ВО "Агропромиздат".-1991- С.284-294.

14. Аникиев В.В. с соавт., 1977 по книге: Радчук И.А., Дунаев Г.В., Колычев Н.М.. Ветеринарная микробиология и иммунология. М., ВО "Агропромиздат" —1991.— С.284-294.

15. Туберкулін очищений (ППД) для ссавців у стандартному розчині. ТУ У 24.4.00497087-645-2001.

16 Туберкулін очищений (ППД) для птиці у стандартному розчині. ТУ У 24.4.00497087-675-2002.

АНОТАЦІЇ:

Протеиногенные свойства производственных штаммов M.bovis Valle и AN5

Кассич Б.Ю., Ребенка Г.И., Ушкалов В.А., Скрипник В.Г., Скрипник А.В., Замазий А.Л.

В соответствии со стандартом ЕС PPD-туберкулин для млекопитающих должен изготавливаться из штаммов M.bovis «AN5» 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 IEKVM-1». Поэтому разработка сухих очищенных PPD-туберкулинов из штаммов M.bovis «AN5» та «Valle» является для Украины актуальной.

Ключевые слова: туберкулез, туберкулин, микобактерии M.bovis Valle и AN5.

Proteinogen poverty of the production strain M. bovis Valle AND AN 5.

Kassich V.U., Rebenko G.I., Ushkalov V.A., V.G. Skrypnyk, A.V. Skrypnyk, Zamaziy A.A.

In accordance with the EU-PPD tuberculin for mammals must be made of strains M.bovis «AN5» or «Valle», while the production protein purified Tuberculin (PPD) for mammals in the standard solution; TYY24.00497087.645-2001, production strain is «M.bovis IEKVM-1. Therefore razrobotkaka dry cleaned PPD-tuberkulioiv of strains M.bovis «AN5» that «Valle» for Ukraine is urgent.

Key Words : tuberculosis, tuberculin, mycobacterium M.bovis «AN5» or «Valle».