

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ВИРОБНИЧОГО ШТАМУ *M.bovis* Valle

Кассіч В.Ю.

*Референтні, еталонні музейні штами використовують для виробництва імунобіологічних препаратів. Контроль культурально-морфологічних та біологічних властивостей референтних штамів є обов'язковим етапом їх використання в якості виробничих. Музейний штам *M.bovis* Valle (KMIEB-9) та його модифікант *M.bovis* Valle (КСП) відрізняються швидкістю росту на поживних середовищах та рівнем продукції туберкулопртеїнів і є перспективними для виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців.*

Постановка проблеми у загальному вигляді. 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) 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).

ППД-туберкулін виготовляють із вирощених на рідкому синтетичному живильному середовищі Сотона виробничих штамів *M.bovis* «AN5» або «Valle» шляхом стерилізації культур автоклавуванням, відокремлення бактеріальної маси, одержання й стерилізації культуральних фільтратів (стерилізуюча фільтрація), осадження протеїну розчином трихлороцтової кислоти, переосадження його насиченим розчином сірчаноокислого амонію, очищення від солей за допомогою діалізу з подальшим визначенням концентрації протеїну в 1 см³ розчину [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10,11,12].

Для виготовлення HCSM-туберкуліну мікобактерії культивують на модифікованому синтетичному поживному середовищі Dorst-Henley, інактивують поточною парою, фільтрують. Культуральний фільтрат концентрують шляхом випарювання і стерилізують фільтрацією [7,12].

Стандарт ЕС PPD-туберкуліну для ссавців надає Institute voor Dierhouderij en Diergezondheid (ID-DLO), Lelystad, The Netherlands. PPD-туберкулін повинен мати ефективність 50 000 ЕСТ / мл та випускатися в ліофілізованому вигляді в ампулах по 1,8 мг PPD (тобто 0,0002 мг PPD еквівалентні одній міжнародній одиниці туберкуліну). Препарат повинен виготовлятися зі штамів *M.bovis* «AN5» або «Valle» [12], в той час як при виготовленні «Туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців в стандартному розчині» ТУУ 24.00497087.645-2001, виробничим штамом є «*M.bovis* ІЕКВМ-1» [3, 7, 12]. Тому розробка вітчизняного сухого очищеного PPD- та HCSM-туберкуліну з штамів *M.bovis* «AN5» або «Valle» є актуальним завданням [7,12].

Мета роботи. Метою роботи було порівняльне вивчення біологічних властивостей виробничого штаму *M.bovis* Valle (КМІЄВ-9) та його модифікантів з використанням світлової та електронної мікроскопії, культуральними, біохімічними, біологічними, молекулярно-генетичними методами.

Матеріали та методи. Матеріалом для досліджень були мікобактерії виду *M.bovis*, штаму Valle (модифіканти КМІЄВ-9 та КМІЄВ-КСП). В рамках договору про співпрацю з РУП "Інститут експериментальної ветеринарії ім. С.Н.Вишелеського" (республіка Білорусь) згідно акту передачі виробничих та еталонних штамів бактерій (від 1 лютого 2010 р.) СНАУ отримав від партнера референтний штам *Mycobacterium bovis* Valle (КМІЄВ - 9) і паспорт на нього. Штам *M. bovis* Valle (КМІЄВ - 9) переданий для зберігання і спільного вивчення його біологічних і протейногенних властивостей Сумській біологічній фабриці. Молекулярно-генетичні, біохімічні дослідження та перехресний імуноелектрофорез проводили на базі Білоруського науково-дослідного Інституту експериментальної ветеринарії. Геномну ДНК з культур мікобактерій виділяли методом фенол-хлороформної екстракції. Для електронно-мікроскопічного дослідження (на базі Інституту невідкладної хірургії (м .Харків) препарати (культури мікобактерій на живильних середовищах) фіксували у 1 % забуференому розчині чотирьохокису осмію протягом 2-3 годин при температурі 4°C. Після фіксації бактеріальні клітини відмивали у буферному розчині, дегідрували у спиртах зростаючої концентрації та ацетоні та вносили у суміш епоксидних смол (епон-аралдіт). Полімеризацію білків здійснювали у термостаті при температурі 60° С протягом двох діб. Ультратонкі зрізи готували на ультрамікротомі УМТП-6 та після контрастування цитратом свинцю вивчали під електронним мікроскопом ЕМВ-100 БР з прискорюючою напругою 75

кВт. Збільшення підбиралось адекватно меті дослідження. Культурально-морфологічні та біологічні дослідження проводили за стандартними методиками.

Аналіз результатів досліджень та розв'язання проблеми. Мікобактерії штаму *M.bovis* Valle спирто - кислотостійкі мікроорганізми, за Цілем-Нільсеном фарбуються в червоний колір, нерухливі, джгутиків не мають; спор та капсул не утворюють. В мазках, виготовлених з культур, вирощених на щільних та рідких синтетичних та елективних живильних середовищах: Гельберга, Левенштейна-Ієнсена, сухому живильному середовищі для прискореного культивування мікобактерій (Патент Укр.№54203 А; розробники Кассіч Ю.Я., Кассіч В.Ю. з співав.), Сотона різних модифікацій, пофарбованих за Ціль-Нільсеном мікобактерії мають вигляд паличок, розміром 0,3-0,6 x 1,5 мкм (до 10 мкм). Всередині паличок інколи помітні зерна. На МЛА та МПБ штам не росте; росте на яєчних та картопляних живильних середовищах тільки при 37° С

При вивченні препаратів *M. bovis* з середовища Павловського та Левенштейна-Ієнсена відзначали, що мікобактерії бичачого виду мають вигляд коротких або помірно довгих овоїдних паличок.(Рис. 1) Відзначається значний поліморфізм культур, який залежить від терміну вирощування та середовища культивування. Всередині клітин помітно зернистість (зерна Муха). Великі зерна розташовані, як правило, ближче до полюсів клітини. Крім того, в цитоплазмі деяких клітин помітні мікрогранули та вакуолі. Окремі мікрогранули в деяких випадках утворюють макрогранули, які досягають по розміру діаметру бактеріальних клітин, внаслідок чого утворюється нерівна поверхня останніх. На поверхні деяких клітин крім оболонки можна розрізнити фрагменти мікрокапсули. У окремих клітин помітна багатошарова структура оболонки (мікрокапсула, клітинна стінка, цитоплазматична мембрана). Окремі зерна Муха лежать зовні мікробних клітин. В деяких препаратах помітні клітини з перетяжками та міжклітинними ретикулярними тяжами. На поперечних та впродовжних зрізах у деяких мікробних клітинах помітно нуклеоїд (ядерна субстанція) на різних стадіях розвитку та поділу. У деяких клітинах помітно хромосоми, які спіралізуються або деспіралізуються.



Р и с і . Мікобактерії штаму *M.bovis* Valle. В препараті переважають подовжені паличкоподібні мікроорганізми на різних стадіях поділу. Збільшення: 24000 x2,4. (Фото автора).

Культивуються досліджені штами мікобактерій в аеробних умовах на елективних живильних середовищах: Петран'яні, Гельберга, Левенштейна-Ієнсена, Фінн-2, ФАСТ -ЗЛ, Павловського, Сотона та інших. Ростуть мікобактерії *M.bovis* Valle (КМІЕВ-9) дуже повільно: впродовж 20-60 діб. В процесі адаптації зазначеного штаму до розробленого нами виробничого синтетичного поживного середовища Сотона-СБ швидкість росту його вдалося підвищити практично у двічі, що трактується нами як наслідок фенотипової неспадкоємної мінливості. Таке прискорення росту є корисним при використанні штаму в якості виробничого при виготовленні ППД-туберкуліну. Одержана таким чином субкультура із зміненним в корисному напрямку фенотипом (фенотиповий модифікатор) отримав назву *Mbovis* Valle (КМІЕВ-КСП).

На живильних середовищах *M.bovis* (Valle) ростуть у вигляді гладеньких (S-форма) та шорстких крихкуватих (R-форма) матових колоній або скупчень, а також у вигляді зморшкуватого нальоту білого, кремового, або біло-жовтого кольору (суцільний ріст).

На рідких живильних середовищах *M.bovis* Valle (КМІЕВ-9 та КСП) утворює корд-фактор. Колонії культур сухі, дрібні, кольору слонової кістки. Швидкість росту в субкультурі 10-20 діб. На рідких живильних середовищах утворює кришкувату плівку, без помутніння середовища. Твін 80 не гідролізує, нітроредуктазна реакція негативна. В перехресному імуноелектрофорезі з референс-сироваткою *M. bovis* №8 утворює 12-15 преципітатів, ідентичних преципітатам антигенів *M. bovis* №8. Штам є помірно патогенним для морських свинок та кролів. При підшкірному зараженні в дозі 1 мг на тварину у морських свинок масою 300-350 г та кролів масою 2-3 кг розвиваються ознаки туберкульозу з ураженням печінки, селезінки та легень, тварини гинуть впродовж 3 місяців з картиною генералізованого туберкульозу. Дає позитивну реакцію в ПЛР з використанням праймерів 6110.

В подальшому культивування бактеріальної маси мікобактерій та одержання очищеного протешу проводили методами, передбаченим «Інструкцією по виготовленню і контролю туберкуліну очищеного (ППД) у стандартному розчині» (розробники Кассіч Ю.Я., Завгородній А.І., Кассіч В.Ю. та ін.) на середовищі Сотона-СБ з виробничим штамом *M.bovis*-ІЕКВМ-1 (Дослід 1), штамом *M.bovis* Valle (КМІЕВ-9) (Дослід 2) та з досліджуванним фенотиповим модифікантом, що отримав назву *M.bovis* Valle (КМІЕВ-КСП). Результати проведених досліджень (патентуються) свідчать що модифіканти штаму *M.bovis* Valle КМІЕВ-КСП та КМІЕВ-9 є високопротейногенними (особливо КМІЕВ-КСП) і перспективними при виробництві ППД-туберкуліну для ссавців.

Висновки і перспективи подальших досліджень. Штам *M.bovis* Valle (модифіканти КМІЕВ-9 та КМІЕВ-КСП) є високопротейногенним і перспективними при виробництві ППД-туберкуліну для ссавців.

Список літератури:

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.. КХЯ.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 / Ю.Я.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.Волосянко, 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.: А\реф. 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.

П. 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.І.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.

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ВИРОБНИЧОГО ШТАМУ *M.bovis* Valle

Кассіч В.Ю.

*Референтні, еталонні музейні штами використовують для виробництва імунобіологічних препаратів. Контроль культурально-морфологічних та біологічних властивостей референтних штамів є обов'язковим етапом їх використання в якості виробничих. Музейний штам *M.bovis* Valle (KMIEB-9) та його модифікант *M.bovis* Valle (КСП) відрізняються швидкістю росту на поживних середовищах та рівнем продукції туберкулопротеїнів і є перспективними для виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців.*

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА *M.BOVIS* VALLE

Кассич В.Ю.

*Референтные, эталонные, музейные штаммы используют для производства иммунобиологических препаратов. Контроль культурально-морфологических и биологических свойств референтных штаммов является обязательным этапом их использования в качестве производственных. Музейный штамм *M.bovis* Valle (KMIEB-9) и его модификант *M.bovis* Valle (КСП) отличаются скоростью роста на питательных средах*

и уровнем продукции туберкулопротеинов и являются перспективными для производства ППД-туберкулина для млекопитающих.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF PRODUCTION STRAINS M.BOVIS VALLE

Kassich V.Y., Ushkalov V.A., V.G. Shypnyk, A.V. Shypnyk

Referentnyye, reference, museum strains used for the production of immunobiological preparations. Control culture-morphological and biological properties of strains refer entryh is an obligatory stage of their use as industrial. Museum strain M.bovis Valle (KMIEV-9) and its modificants M.bovis Valle (PCB) differ in the speed of growth in nutrient media and the level of production tuberkuloproteinov and are promising for the production of PPD tuberculin in mammals.

In accordance the EU-PPD tuberculin for mammals should be made of strains M.bovis AN5 or Valle, while in Ukraine in the production of purified Tuberculin (PPD) for mammals in the standard solution, TU-24.00497087.645 2001 strain used M.bovis IEKVM-1. Given the trend of Ukraine's European integration, the development of dry tuberculin PPD-treated according to the requirements of Council Directive number 97 12 ES (using strains M.bovis AN5 and Valle) is a topical for Ukraine. The results presented in the article study the biological properties of these strains.