

## ПРОТЕІНОГЕННІСТЬ ВИРОБНИЧИХ ШТАМІВ ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ППД-ТУБЕРКУЛІНУ ДЛЯ ССАВЦІВ

**В.Ю. Кассіч**, д.вет.н., професор, Сумський національний аграрний університет

**М.Д. Камбур**, д.вет.н., професор, Сумський національний аграрний університет

**В.О. Ушкалов**, д.вет.н., професор, член-кореспондент НААН України, ДНКІБШМ

**А.А. Замазій**, д.вет.н., доцент, Полтавський державна аграрна академія

**О. В. Волосянко**, д.вет.н., старший науковий співробітник, Національний університет біотехнології та природокористування України

У відповідності із стандартом ЄС PPD-туберкулін для ссавців має 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* ІЕКВМ-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 атипичних 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 (Proteinpurifiedderivative) або HCSM (Heat-concentratedsynthetic-mediumtuberculin). Згідно стандарту ЄС, що надає InstitutevoorDierhouderijenDiergenonzondheid (ID-DLO), Lelistad, TheNetheriands, PPD-туберкулін для ссавців повинен мати ефективність 50 000 ЄСТ / мл та 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-туберкуліну з штамів *M.bovis* «AN5» або «Valle» є актуальним завданням [7,12].

**Мета роботи.** Основою ветеринарних біологічних імунопрепаратів є виробничий штам. Тому метою нашої роботи було вивчення протеїногенних властивостей виробничих штамів *M.bovis* Valle (модифікатор 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 протеїну розчином трихлороцтової кислоти, переосадження його насиченим розчином сірчанокислого амонію, очищення від солей за допомогою діалізу з подальшим визначенням концентрації протеїну в 1 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> за ГОСТ 25336; прилад перегінний К'ельдаля; холодильник; шафу сушильну з температурою нагрівання до 110<sup>0</sup> 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<sup>3</sup>; крапельницю; папір лакмусовий;

фільтри паперові знезолені; кислоти сірчану за ГОСТ 4204 концентровану, щільністю 1,84 г/см<sup>3</sup> і розчин 0,05 моль/дм<sup>3</sup>; натрій гідроксид за ГОСТ 4328, розчин з масовою часткою від 30 до 33% і розчин 0,1 моль/дм<sup>3</sup>, 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%; кислоти трихлороцтову, розчин з масовою часткою 5 та 10 %; воду дистильовану за ГОСТ 6709.

Випробування проводили таким чином. В пробірки вносили по 2 см<sup>3</sup> стандартного розчину туберкуліну. В першу пробірку вносили туберкулін, серії виготовленої з виробничого штаму M.bovisValle-КСП, а в другу - туберкулін, серії виготовленої з виробничого штаму AN-5.

В пробірки з 2 см<sup>3</sup> розчину туберкулінів вносили по 2 см<sup>3</sup> розчину три хлороцтової 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 три хлороцтової 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.bovisValle-КСП та AN-5 висушували на повітрі, потім розміщували у двох колбах К'ельдаля, додавали по 2 см<sup>3</sup> концентрованої сірчаної кислоти й мінералізували нагріванням.

Мінералізацію проводили у присутності каталізатора – перекису водню, який додавали по 0,5 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup>. Вичерпаність переносу перевіряли індикатором метиловим рожевим до одержання рожевого кольору в останній пробі води.

В 2 колби Ерлеймейера наливали по 20см<sup>3</sup> розчину сірчаної кислоти 0,05 моль/дм<sup>3</sup> 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 гідроксиду натру 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 см<sup>3</sup> розчину. Завершення відгону перевіряли лакмусовим папером.

Вміст приймальних колб титрували розчином гідроксиду натру 0,1 моль/дм<sup>3</sup> до зміни забарвлення розчину від лілового до зеленого (індикатор Таширо).

Одночасно визначали масову частку азоту в знезоленому фільтрі.

Масову концентрацію білка в мг/см<sup>3</sup> у пробах туберкуліну серії, виготовленої з виробничого штаму M.bovisValle (модифікатор КСП) та серії, виготовленої з виробничого штаму M.bovisAN-5 (X1 та X2) обчислюють за формулою (2):

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

де V – об'єм 0,1 моль/дм<sup>3</sup> розчину сірчаної кислоти, що налитий у приймальну колбу при аналізі проби, см<sup>3</sup>;

K – поправочний коефіцієнт до титру 0,1 моль/дм<sup>3</sup> розчину сірчаної кислоти;

V<sub>1</sub> – об'єм 0,1 моль/дм<sup>3</sup> розчину гідроксиду натрію, що витрачений на титрування проби, см<sup>3</sup>;

K<sub>1</sub> – поправочний коефіцієнт до титру 0,1 моль/дм<sup>3</sup> розчину гідроксиду натрію;

V<sub>2</sub> – об'єм 0,1 моль/дм<sup>3</sup> розчину сірчаної кислоти, що налитий у приймальну колбу при аналізі проби, см<sup>3</sup>;

V<sub>3</sub> – об'єм 0,1 моль/дм<sup>3</sup> розчину сірчаної кислоти, що витрачений на титрування проби при аналізі знезоленого фільтру, см<sup>3</sup>;

1.4 – маса азоту, що відповідає 1 см<sup>3</sup> 0,1 моль/дм<sup>3</sup> розчину сірчаної кислоти, мг;

Згідно існуючих вимог [15,16], масова частка білка у туберкуліні повинна бути (0,8±0,2)мг/см<sup>3</sup>. Масова частка білка у туберкуліні серії (X1), виготовленої з виробничого штаму M.bovisValle (модифікатор КСП) становила (0,86±0,07)мг/см<sup>3</sup>, а у туберкуліні серії (X2), виготовленої з виробничого штаму M.bovisAN-5 -- (0,87±0,1)мг/см<sup>3</sup>.

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

### Список використаної 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. – Киев: "Урожай", 1990.—304с.
3. Кассич 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. Кассич Ю.Я. Високоєфективний вітчизняний туберкулін / Ю.Я.Кассич, В.Ю Кассич., П.М.Тихонов, В.М. Горжеєв. – Аграрна наука – виробництву.—2005.– №1. – С.26-27.
7. Кассич 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.: 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.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.
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.

### **Кассич В.Ю., Камбур М.Д., Ушкалов В.О., Замазий А.А., Волосянко О.В. ПРОТЕИНОГЕННОСТЬ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ППД-ТУБЕРКУЛИНА ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

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 актуальным.

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

### **Kassich V.U., Kambur M.D., Ushkalov V.A., Zamazyi A.A., Volosianko O.V. PROTEINOGENIC PRODUCTION STRAINS FOR THE PREPARATION OF MAMMAL SPPE-TUBERCULIN.**

In accordance with the EU-PPD tuberculin for mammals must be made of strains *M.bovis* «AN5» or «Valle», while the production of «purified Tuberculin (PPD) for mammals in the standard solution» TYY 24.00497087.645-2001, 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».

Рецензент: д.вет.н., професор Фотіна Т.І.  
Дата надходження до редакції: 08.12.2013 р.