

УДК 619:616:98:579.873.21:631.153.7  
© 2018

**В.Ю. КАСИЧ,**  
доктор ветеринарних наук

**Ю.А. БАЙДЕВЛЯТОВ,**  
кандидат ветеринарних наук

**О.Г. ЛЕОНЕНКО,**  
студент магістратури

**В.О. ГОЛОВКО,**  
доктор ветеринарних наук,  
академік НААН України

**О.В. КАСИЧ,**  
аспірант

Сумський національний  
аграрний університет, Україна  
Харківська державна  
зооветеринарна академія, Україна  
E-mail: kassich\_v\_u@ukr.net

вул. Герасима Кондратьєва, 160, м. Суми  
вул. Академічна, 1, смт Мала Данилівка,  
Дергачівський район, Харківська область

РОЗРОБКА ППД-ТУБЕРКУЛІНУ  
ДЛЯ ССАВЦІВ  
З ВИКОРИСТАННЯМ  
ВИРОБНИЧИХ ШТАМІВ  
*M. bovis Vallee* КМІЕВ-9,  
*M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ,  
МЕТОДІВ МІКРОФІЛЬТРАЦІЇ  
ТА УЛЬТРАЦЕНТРИФУГУВАННЯ

*Визначено, що відібрані шляхом селекції та задепоновані в ДНКІБШМ виробничі штами *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 та *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ є високопротейногенними та відповідають вимогам Директиви Ради ЄС 97/12 від 17.03.1997 р. Штами використані під час виготовлення дослідно-виробничих серій ППД-туберкуліну для ссавців очищеного. Для адаптації, селекції та накопичення бактерійної маси виробничих штамів розроблено живильні середовища Сотона-КФ та Сотона-ХБ, на яких культури *M. bovis* починають зростати раніше на 4,2–1,1 доби і накопичують більше бактерійної маси (мікробна плівка формується на 4,1–0,9 доби раніше). Розроблено нові технологічні прийоми виготовлення ППД-туберкуліну з використанням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування за 14 тис. об./хв, що дозволило отримати високоактивний та специфічний діагностичний алерген.*

**Ключові слова:** збудники туберкульозу, мікобактерії, алергічна діагностика, алерген, виробничий штам, технологічні прийоми.

**Постановка проблеми.** Серед зоонозних захворювань туберкульоз за своїм соціальним, економічним епізоотологічним та епі-

деміологічним значенням займає особливе місце [1–3]. Туберкульоз тварин спричиняє значні економічні збитки аграрному секто-

ру та становить суттєву загрозу здоров'ю людей. Міжнародний ветеринарний кодекс МЕБ визначає туберкульоз як захворювання, що вимагає обов'язкового декларування [4–6]. Боротьба з цією зооантропонозною хворобою має й соціально-гігієнічне та епідеміологічне значення [1–9].

Документи МЕБ та ЄС, як основний метод виявлення заражених туберкульозом тварин, передбачають тест на наявність гіперчутливості сповільненого типу (ГЧСТ) – туберкулінову пробу. В Україні для його проведення державне підприємство – Сумська біологічна фабрика виготовляє туберкулін очищений (ППД) для ссавців, розроблений та вдосконалений фахівцями лабораторії туберкульозу ННЦ ІЕКВМ НААН України з використанням виробничого штаму *M. bovis* ІЕКВМ-1 [8, 9]. Під час виготовлення ППД туберкуліну найбільш вразливою ланкою технологічного процесу залишається глибинна стерилізуюча фільтрація через азбестові фільтри. Їх застосування не дозволяє одержати гарантовано стерильний препарат. Крім того, використання глибинних фільтрів призводить до значних втрат білка, що знижує вихід препарату [4, 8, 9]. Впровадження мембранних методів у технологію виготовлення ППД-туберкуліну дозволяє підвищити екологічну безпеку виробництва за рахунок виключення з технології азбестових фільтрів, знизити використання води та втрати туберкулопротеїну [2, 4, 8, 9].

Наведені факти переконують, що тваринництво України з поголів'ям великої рогатої худоби близько 4 млн голів щорічно потребує виготовлення й використання великої кількості високоактивного та специфічного ППД-туберкуліну для ссавців, який відповідає вимогам Європейського співтовариства і забезпечує ефективне алергічне дослідження худоби на туберкульоз (за 2016 рік проведено 3,4 млн таких досліджень на туберкульоз). Тому актуальними і перспективними для тваринництва й ветеринарної медицини України є пошук та впровадження у виробництво високопротеїногенних виробничих штамів *Mycobacterium bovis*, розробка ефективних і високопродуктивних

живильних середовищ для їх культивування, впровадження в технологічний процес виготовлення ППД-туберкуліну мембранних технологій, використання методів мікрофільтрації та ультрацентрифування, розробка нових та оптимізація і гармонізація існуючих вітчизняних алергенів відповідно з вимогами ЄС [7–9].

**Мета роботи** полягала в розробці ППД-туберкуліну для ссавців з використанням виробничих штамів *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 та *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ, методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифування.

**Виклад основного матеріалу.** Першим етапом роботи був підбір виробничих штамів. Для цього провели адаптацію, дослідження морфологічних, культуральних та біологічних властивостей та депонування виробничого штаму *M. bovis Vallee*, оскільки саме цей штам і штам AN-5 рекомендує Директива Ради ЄС 97/12 від 17.03.1997 р. як виробничі під час виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців.

Одержаний нами в рамках творчого обміну з РУП ІЕВ ім. С.Н. Вишелеського (м. Мінськ) сублімований штам збудника туберкульозу бичачого виду, який згідно з паспортом штаму має назву “*M. bovis Vallee* КМІЕВ-9”, розконсервували та адаптували до живильних середовищ Павловського, Левенштейна-Іенсена, ІЕКВМ, Сотона-КФ та Сотона-ХБ [1, 2, 9].

Під час культивування штаму збудника туберкульозу бичачого виду *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 на живильному середовищі Сотона-КФ для прискореного накопичення бактеріальної маси [6, 9] відзначали прискорення росту мікобактерій і підвищення накопичення бактеріальної маси порівняно зі середовищем Сотона за класичним прописом. Появу первинного росту культури виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 спостерігали на 3,0–0,1 доби раніше; формування суцільного росту (мікробної плівки) – на 6,0–0,3 доби раніше. Вихід бактеріальної маси був на 7,4–0,3 мг більшим. Тобто середовище Сотона-КФ мало стимулюючі ріст мікобактерій, а також селективні властивості, що сприяло отри-

манню штаму з прискореним ростом мікобактерій. Відібраному шляхом селекції ізоляту мікобактерій з прискореним ростом після ретельного вивчення його культуральних, морфологічних та біологічних властивостей надали назву “виробничий штам збудника туберкульозу бичачого виду *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ” [1, 2, 5, 9].

У процесі дослідження електронно-мікроскопічних препаратів з культур виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ відзначили, що мікобактерії мають вигляд коротких або помірно довгих паличок, розташованих у вигляді скупчень, конгломератів. Спостерігався поліморфізм мікроорганізмів [1, 8, 9].

За бактеріологічних досліджень проводили культивування та накопичення бактеріальної маси мікобактерій штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 та штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ на середовищі Сотона-ХБ (таблиця). Водночас визначали терміни початку первинного, суцільного росту та накопичення бактеріальної маси виробничих штамів.

У результаті дослідів виявили, що культура *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ починала рости раніше на 2,0–0,1 доби, давала більше на 6,0–0,1 мг накопиченої бактеріальної маси. Мікробна плівка формувалася на 4,5–0,2 доби раніше порівняно з вихідним штамом *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9.

Таким чином, використання виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ дозволяє

прискорити ріст і підвищити на 6 мг накопичення бактеріальної маси мікобактерій з одного флакона і дає можливість скоротити технологічний процес та збільшити вихід туберкуліну.

Основою для виготовлення очищених ППД-туберкулінів для ссавців та птиці і алергенів з атипичних мікобактерій (КАМ, ААМ) є протеїни мікобактерій, які містяться у фільтратах культур. Принцип отримання очищеного деривату туберкулопротеїну (Purified Protein Derivatіv – PPD) з культурального фільтрату мікобактерій, культивованих на синтетичному живильному середовищі, методом осадження трихлороцтовою кислотою лишається незмінним з часу розробки технології виробництва ППД-туберкуліну F.V. Seibert (1934, 1949). У подальшому метод був удосконалений [1–9], але недоліком його виявився низький вихід та обмежена специфічність кінцевого продукту – ППД-туберкуліну. Крім того, найбільш вразливою ланкою технологічного процесу є глибинна стерилізуюча фільтрація через азбестові фільтри, що не дозволяє одержати гарантовано стерильний препарат та призводить до втрат на таких фільтрах значної кількості білка.

Запропонована нами технологічна схема одержання ППД-туберкуліну включає обробку культуральної рідини після відділення бактеріальної маси виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ методом мемб-

**Початок первинного й суцільного росту (формування мікробної плівки) та накопичення бактеріальної маси**

Показник	Штам	
	<i>M. bovis Vallee</i> КМІЕВ-9	<i>M. bovis Vallee</i> КМІЕВ-9КМ
Початок первинного росту, доба	10,0–1,0	8,0–1,0
Формування мікробної плівки, доба	19,5–3,0	15,0–0,9
Накопичення бактеріальної маси, мг	59,5–0,3	65,5–0,2

ранної мікрофільтрації з використанням капсул Sartoclean®CA з діаметром пор 0,45 мкм та відділення білкових фракцій туберкуліну після осадження їх трихлороцтовою кислотою шляхом ультрацентрифугування за 14 тис. об./хв з подальшою стерилізуючою мікрофільтрацією одержаних пермеатів через капсули Sartoclean®CA з діаметром пор 0,2 мкм.

Моношарові фільтри Sartoclean®CA з ацетату целюлози завдяки вбудованій системі попередньої фільтрації за утримуючої мікробної фільтрації забезпечують найвищі показники загальної пропускної здатності і найвищий вихід протеїну. Після мікрофільтрації на ультрафільтраційних мембранних фільтрах Sartoclean®CA з діаметром пор 0,45–0,2 мкм (NBSP) та НОММ 150–1000 кДа препарат містить білкові фракції мікобактерій з молекулярною масою 150–1000 кДа, які мають найвищі показники діагностичної активності та специфічності [4–7].

Протеїн зі суспензії відокремлювали від рідини шляхом ультрацентрифугування за 14 тис. об./хв на промисловому високооборотному сепараторі малого об'єму. Під час використання для виготовлення туберкуліну технології з мембранною мікрофільтрацією та ультрацентрифугуванням у препараті достовірно на 8,6–0,1 г збільшується вихід туберкулопротеїну після осадження трихлороцтовою кислотою, вихід туберкулопротеїну з 1 л середовища – на  $0,7 \pm 0,1$  г та масова частка білка – на 0,6–0,1 мг/см<sup>3</sup>. За рахунок використання ультрафільтраційних мембран з пропускною здатністю 150–1000 кДа та капсул Sartoclean®CA з діаметром пор 0,45–0,2 мкм препарат виходить стерильним, високоочищеним, містить білкові фракції з найвищими показниками діагностичної активності і специфічності (150–1000 кДа), того часу як глибинна стерилізуюча фільтрація через азбестові фільтри не дозволяє одержати гарантовано стерильний препарат та призводить до втрат значної кількості білка і води.

### Висновки

1. Під час виготовлення експериментальних серій ППД-туберкуліну для ссавців очищеного розроблені нові технологічні прийоми з використанням виробничого штаму *M. bovis Vallee KMIEB-9KM* і методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування, що дозволило отримати високоактивний та специфічний діагностичний алерген. У препараті достовірно збільшуються ( $p < 0,05$ ) вихід протеїну після осадження ТХО на 8,6–0,5 г, вихід туберкуліну з 1 л середовища на 0,7–0,1 г та масова частка білка на 0,6–0,1 мг/см<sup>3</sup>. Препарат виходить стерильним та високоочищеним. Після мікрофільтрації на ультрафільтрацій-

них мембранних фільтрах Sartoclean®CA з діаметром пор 0,45–0,2 мкм та НОММ 150–1000 кДа препарат містить білкові фракції мікобактерій з молекулярною масою 150–1000 кДа, що мають найвищі показники діагностичної активності та специфічності.

2. Розроблений алерген є активним та специфічним, відповідає вимогам Директиви Ради ЄС 97/12 від 17.03.1997 р. і дає можливість проводити якісну та своєчасну алергічну діагностику туберкульозу ссавців.

3. Запропоновані технологічні підходи можуть бути використані під час виготовлення ППД-туберкуліну для птиці та алергену з атипичних мікобактерій.

### Бібліографія

1. Вивчення властивостей виробничого штаму *M. bovis Vallee KMIEB-9KM* / В.О. Головка, О.В. Кассіч, В.Ю. Кассіч, К.Ю. Колеснікова, В.Г. Кошельник // Вісник Сумського

національного аграрного університету. – 2015. – Вип. 1(36). – С. 106–109.

2. Головка В.О. Сучасні проблеми інфекційної патології в Україні / В.О. Головка,

*О.В. Кассіч, В.Ю. Кассіч* // Вісник Сумського НАУ. – 2016. – Вип. 6/38. – С. 119–124. – (Серія: Ветеринарна медицина).

3. Продукція туберкулопротеїнів виробничим штамом *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ / *В.О. Головка, О.В. Кассіч, В.Ю. Кассіч, К.Ю. Колеснікова, В.Г. Кошельник* // Вісник Сумського національного аграрного університету. – 2015. – Вип. 7(37). – С. 104–108.

4. *Кассіч А.В.* Изменчивость облученных микобактерий / *А.В. Кассіч, А.Г. Левченко, В.Ю. Кассіч* // Ученые записки учреждения образования “Витебская ордена “Знак Почета” государственная академия ветеринарной медицины” (январь–июнь). – 2016. – Т. 52, вып. 1. – С. 38–42.

5. Алергічна діагностика зоонозів та засоби для її проведення / *В.Ю. Кассіч, А.Г. Левченко, О.В. Кассіч, В.О. Головка* // Вісник Сумського національного аграрного університету. – 2016. – Вип. 1(40). – С. 164–169.

6. Контроль якості експериментальної серії ППД-туберкуліну для ссавців / *В.Ю. Кассіч, А.Г. Левченко, О.В. Кассіч, В.О. Головка, Т.О. Терпецька, К.Ю. Колеснікова* // Вісник

Сумського національного аграрного університету. – 2016. – Вип. 11(39). – С. 100–106.

7. *Левченко А.Г.* Модифицированная методика подготовки производственного штамма *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ для исследований растровым электронным микроскопом / *А.Г. Левченко, А.В. Кассіч* // Молодежь и инновации–2017; Учреждение образования “Белорусская государственная сельскохозяйственная академия”. – 2017. – Ч. 2. – С. 105–107.

8. Патент на корисну модель “Виробничий штам *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ для виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців” за № 109231, виданий згідно зі заявкою № а201505875, пріоритет від 5.08.2016 року. Розробники: *В.Ю. Кассіч, О.В. Кассіч, К.Ю. Колеснікова, В.Г. Кошельник*.

9. Патент на корисну модель за № 120698 від 10.11.2017 згідно зі заявкою u201708588 Спосіб виготовлення ППД-туберкуліну з використанням методів мікрофільтрації та ультрацентрифування. Розробники: *К.Ю. Колеснікова, О.В. Кассіч, В.Ю. Кассіч, В.Г. Кошельник, Т.О. Терпецька*.