



УДК 619:614.48:616:579.873.21

В.Ю. КАССІЧ, докт. вет. наук, професор
Сумський національний аграрний університет
В.Г. СКРИПНИК, докт. вет. наук, професор
А.В. СКРИПНИК, канд. вет. наук

В.О. УШКАЛОВ, докт. вет. наук, професор,
член-кореспондент НААН України
Державний науково-контрольний інститут
біотехнології і штамів мікроорганізмів, Київ

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ *M. BOVIS* «VALLE» ТА «AN5» ПРИ ВИГОТОВЛЕННІ PPD-ТУБЕРКУЛІНУ ДЛЯ ССАВЦІВ ЗГІДНО З ВИМОГАМИ ЄС

*Відповідно до стандартів ЄС PPD-туберкулін для ссавців має виготовлятися зі штамів *M. bovis* «AN5» або «Valle», тоді як в Україні під час виробництва «Туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців у стандартному розчині» (ТУУ 24.00497087.645-2001) використовують штам «*M. bovis* ІЕКВМ-1». Враховуючи євроінтеграційні тенденції України, розроблення сухих очищених PPD-туберкулінів згідно з вимогами Директиви Ради ЄС № 97/12/ЄС (з використанням штамів *M. bovis* «AN5» та «Valle») є для України актуальним. У статті наведено результати вивчення біологічних властивостей зазначених штамів.*

Ефективна боротьба з туберкульозом тварин можлива лише при всебічному вивченні біології збудника, епізоотології, патогенезу, методів профілактики, економічних та екологічних факторів, які впливають на перебіг хвороби, за умов забезпечення тваринництва дієвими 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 у 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 (Ю.Я. Кассіч,

А.І. Завгородній, В.Ю. Кассіч та ін.) [3–5], впроваджені у виробництво, виготовляються Сумською біологічною фабрикою й забезпечують проведення планових діагностичних досліджень на туберкульоз на території України [3–5].

Проте слід враховувати, що при торгівлі тваринами між країнами Європейського співтовариства законодавчим актом є Директива Ради ЄС № 97/12/ЄС від 17 березня 1997 р., яка вносить зміни й модернізує Директиву № 64/432/ЄС [6]. Відповідно до цих документів туберкулінізацію тварин проводять з використанням туберкулінів PPD (Protein purified derivative) або HCSM (Heat-concentrated synthetic-medium tuberculin). При цьому ППД-туберкулін виготовляють згідно з вимогами GMP 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 сірчанокислового амонію, очищення від солей за допомо-

гою діалізу з подальшим визначенням концентрації протеїну в 1 см³ розчину [1–10].

Для виготовлення HCSM-туберкуліну мікобактерії культивують на модифікованому синтетичному живильному середовищі Dorst – Henley, інактивують поточною парою, фільтрують. Культуральний фільтрат концентрують шляхом випарювання і стерилізують фільтрацією [3, 6].

Згідно зі стандартом ЄС, наданим Instituut voor Dierhouderij en Diergezondheid (ID-DLO), Lelystad, The Netherlands, PPD-туберкулін для ссавців повинен мати ефективність 50 000 ЕСТ/мл і випускатися у ліофілізованому вигляді в ампулах по 1,8 мг PPD (тобто 0,0002 мг PPD еквівалентні одній міжнародній одиниці туберкуліну). Препарат має виготовлятися зі штамів *M. bovis* «AN5» або «Valle» [6], тоді як при виготовленні «Туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців у стандартному розчині», ТУУ 24.00497087.645-2001, виробничим штамом є «*M. bovis* ІЕКВМ-1» [3, 5, 6]. Тому розроблення вітчизняного сухого очищеного PPD- та HCSM-туберкуліну зі штамів *M. bovis* «AN5» або «Valle» є актуальним завданням [3, 6].

Мета роботи – порівняльне вивчення біологічних властивостей виробничих штамів *M. bovis* «Valle» (модифікатор КСП) та «AN5» з використанням світлової й електронної мікроскопії, культуральними, біохімічними, біологічними, молекулярно-генетичними методами для подальшого створення на їх базі препаратів для алергічної діагностики туберкульозу тварин, що відповідає вимогам ЄС.



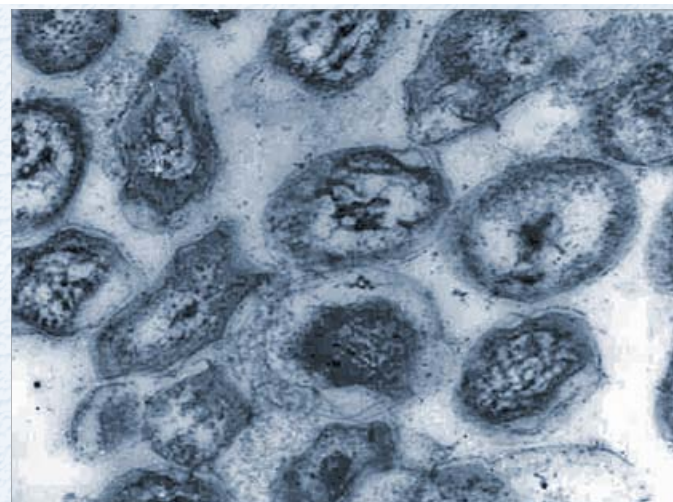
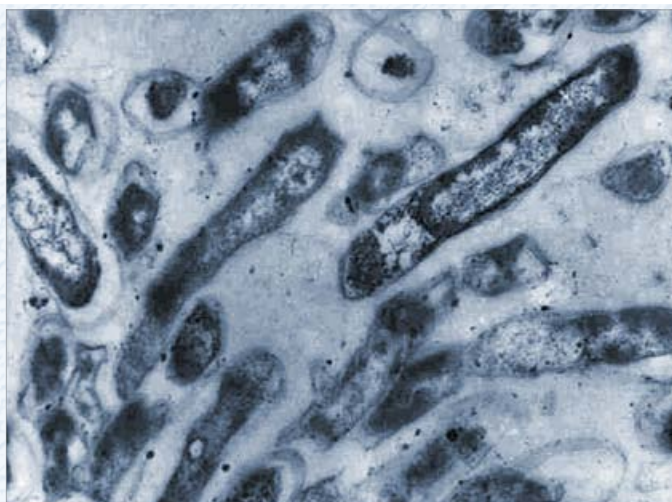


Рис. 1. Мікобактерії штаму *M. bovis* «Valle». У препараті переважають подовжені паличкоподібні мікроорганізми на різних стадіях поділу.
Збільшення: 24 000 × 2,4

Рис. 2. *M. bovis*.
Збільшення 30 000 × 2,4.
(Фото авторів)

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом для досліджень були мікобактерії виду *M. bovis* штамів «AN5» та «Valle» (модифіканти КСП). Молекулярно-генетичні, біохімічні дослідження та перехресний імуоелектрофорез проводили на базі ДНКІБШМ, Білоруського науково-дослідного інституту експериментальної ветеринарії та Сумської біологічної фабрики. Геному ДНК із культур мікобактерій виділяли методом фенолхлороформної екстракції. Для електронно-мікроскопічного дослідження (на базі Інституту невідкладної хірургії, м. Харків) препарати (культури мікобактерій на живильних середовищах) фіксували у 1% забуференому розчині чотириокису осмію протягом 2–3 год при t 4°C. Після фіксації бактеріальні клітини відмивали в буферному розчині, дегідратували в спиртах зростаючої концентрації й ацетоні та вносили у суміш епоксидних смол (епон-аралдит). Полімеризацію білків здійснювали в термостаті при t 60°C протягом двох діб. Ультратонкі зрізи готували на ультрамікромомі 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.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Мікобактерії бичачого виду *M. bovis* штамів «AN5» та «Valle» – спирто- й кислотостійкі мікроорганізми, за Цілем – Нільсеном фарбуються в червоний колір, нерухливі, джгутиків не мають, капсул і спор не утворюють.

У мазках, виготовлених із культур, вирощених на щільних і рідких синтетичних та елективних живильних середовищах Гельберга, Левенштейна – Йенсена, сухому живильному середовищі для прискореного культивування мікобактерій (Патент України №54203 А; розробники Ю.Я. Кассіч, В.Ю. Кассіч зі співавт.), Сотона різних модифікацій, пофарбованих за Цілем – Нільсеном, мікобактерії мають вигляд паличок розміром 0,3–0,6 × 1,5 мкм (до 10 мкм), у середині яких інколи помітні зерна. На МПА та МПБ штам не росте; натомість росте на яєчних і картопляних живильних середовищах тільки при t 37°C.

При вивченні препаратів *M. bovis* відзначали, що мікобактерії бичачого виду мають вигляд коротких або помірно довгих овоїдних паличок (рис. 1, 2)

Відзначається значний поліморфізм культур, який залежить від терміну вирощування й середовища культивування. Всередині клітин помітно зернистість (зерна Муха). Великі зерна розташовані, як правило, ближче до полюсів клітини. Крім того, в цитоплазмі деяких клітин знаходяться мікро-

гранули й вакуолі. Окремі мікрогранули іноді утворюють макрогранули, які за діаметром досягають розміру бактеріальних клітин, унаслідок чого вони мають нерівну поверхню. На поверхні клітин крім оболонки можна розрізнити фрагменти мікрокапсули. Деякі клітини мають багатшарову структуру оболонки (мікрокапсула, клітинна стінка, цитоплазматична мембрана). Окремі зерна Муха лежать зовні мікробних клітин. У деяких препаратах помітні клітини з перетяжками та міжклітинними ретикулярними тяжками.

Культивуються штами *M. bovis* «AN5» та «Valle» (КСП) мікобактерій в аеробних умовах на елективних живильних середовищах: Петраньяні, Гельберга, Левенштейна – Йенсена, Фінн-2, ФАСТ-3Л, Павловського, Сотона тощо. Ростуть мікобактерії дуже повільно – впродовж 20–60 діб. У процесі адаптації штамів *M. bovis* до розробленого нами виробничого синтетичного живильного середовища Сотона-СБ швидкість росту його вдалося підвищити практично удвічі, що розглядають як наслідок фенотипової неспадкоємної мінливості. Таке прискорення росту є корисним у разі використання штамів як виробничих при виготовленні ППД-туберкуліну.

На живильних середовищах штами *M. bovis* «Valle» та «AN5» ростуть у вигляді гладеньких (S-форма) та/або шорстких крихкуватих (R-форма) матових колоній або скупчень, а також зморш-



куватого нальоту білого, кремового або біло-жовтого кольору (суцільний ріст).

На рідких живильних середовищах штами *M. bovis* «AN5» та «Valle» утворюють корд-фактор. Колонії культур сухі, дрібні, кольору слонової кістки. Швидкість росту в субкультурі 10–20 діб. На рідких живильних середовищах утворюють крихкувату плівку без помутніння середовища. Твін 80 не гідролізують, нітроредуктазна реакція негативна. У перехресному імуноелектрофорезі з референс-сироваткою *M. bovis* №8 утворюють 12–15 преципітатів, ідентичних преципітатам антигенів *M. bovis* №8. Досліджувані штами є помірно патогенними для морських свинок і кролів. При підшкірному зараженні в дозі 1 мг на тварину в морських свинок масою 300–350 г та кролів масою 2–3 кг розвиваються ознаки туберкульозу з ураженням печінки, селезінки й легень, тварини гинуть упродовж 3 місяців, у них простежується генералізований туберкульоз. Штами дають позитивну реакцію в ПЛР з використанням праймерів 6110.

Надалі культивування бактеріальної маси мікобактерій досліджуваних штамів й одержання очищеного протеїну проводили методом, передбаченим «Інструкцією по виготовленню і контролю туберкуліну очищеного (ППД) у стандартному розчині» (розробники – Ю.Я. Кассіч, А.І. Завгородній, В.Ю. Кассіч та ін.) на середовищі Сотона. Результати досліджень (нині патентуються) свідчать про те, що виробничі штами *M. bovis* «AN5» та «Valle» є високопротеїногенними й перспективними при виробництві ППД-туберкуліну для ссавців.

ВИСНОВОК

Штами *M. bovis* «AN5» та «Valle» є високопротеїногенними й перспективними при виробництві ППД-туберкуліну для ссавців.

СПИСОК

ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Безгин В.М.** Совершенствование промышленной технологии (ППД) туберкулина и его биохимическая характеристика: авто-

реф. дис. ... канд. вет. наук: 03.00.04 / В.М. Безгин. – М., 1990. – 27 с.

2. **Говоров А.М.** Новые туберкулины / А.М. Говоров, Ф.И. Осташко // Научно-технический бюллетень УНИИЭВ. – 1956. – С. 12–15.

3. **Кассич В.Ю.** Аллергия и аллергическая диагностика инфекционных болезней / В.Ю. Кассич, Н.П. Овдиенко, Е.В. Волосянко, Т.Г. Нестеренко // 36. статей міжнар. наук.-практ. конференції «Сучасні проблеми біотехнології, стандартизації та забезпечення контролю якості ветпрепаратів, кормів та кормових добавок», присвяченої 10-річчю ДНКІБШМ // Вет. біотехнологія. Бюл. № 13 (2). – К., 2008. – С. 123–128.

4. **Кассіч В.Ю.** Мінливість мікобактерій, епізоотологічний моніторинг, засоби і заходи боротьби з туберкульозом тварин в умовах радіаційного впливу: дис. ... докт. вет. наук: 16.00.03 / В.Ю. Кассіч. – Харків, 2004. – 408 с.

5. **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.

6. **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 Міжнар. наук.-практ. конференції «Епізоотологія і профілактика інфекційних хвороб великої рогатої худоби», 14–17 березня 2006 р., Київ. – К., 2006. – С. 42–43.

7. **Линникова М.А.** Очищенный протеин дериват туберкулина / М.А. Линникова // Проблемы туберкулеза. – 1939. – № 12. – С. 3–12.

8. **Лысенко А.П.** Антигены *Mycobacterium bovis* и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота: дис. ... докт. вет. наук: 16.00.03 / А.П. Лысенко. – Минск, 1994. – 379 с.

9. **Патент** Российской Федерации. (19)RU–(11)2031656 (51) 6 А 61 К 39/04. Способ получения туберкулина / А.А. Конарев, Л.В. Агаджанова, Л.С. Помогаева, В.М. Безгин, Н.С. Шевырев, Л.Д. Ничвеева, Е.Н. Солодов, В.Е. Козлов. – (21) 5049029/13.–(46) 27.03.95. – Бюл. № 9.

10. **Патент** Российской Федерации. RU (11)2035924.–(51)6 А 61 К 39/04. Способ получения туберкулина / Н.С. Шевырев, В.М. Безгин, Л.Д. Ничвеева, Е.Н. Солодов,

В.Е. Козлов, А.А. Гринев, А.А. Сорокина, В.А. Алехин, А.Н. Шаров, В.С. Тырина, Н.К. Букова. – (21) 93003234/13.– (46) 27.05.95. – Бюл. № 15.

11. **Туберкулез** животных и меры борьбы с ним / [Ю.Я. Кассич, А.Т. Борзяк, А.Ф. Кочмарский и др.]; под ред. Ю.Я. Кассича. – К.: Урожай, 1990. – 304с.

12. **Туберкулез** сельскохозяйственных животных / [А.М. Колычев, Ю.Я. Кассич, О.В. Мартма и др.]; под ред. В.П. Шишкова и В.П. Урбана. – М.: ВО «Агропромиздат», 1991. – 255 с.

Одержано 20.04.2013

Биологические свойства штаммов *M. bovis* «Valle» и «AN5» при изготовлении PPD-туберкулина для млекопитающих согласно требованиям ЕС. В.Ю. Кассич, В.Г. Скрипник, А.В. Скрипник, В.А. Ушкалов

В соответствии со стандартом ЕС PPD-туберкулин для млекопитающих должен изготавливаться из штаммов *M. bovis* «AN5» или «Valle», в то время как в Украине при производстве «Туберкулина очищенного (ППД) для млекопитающих в стандартном растворе», ТУ 24.00497087.645-2001, используют штамм «*M. bovis* ИЭКВМ-1». Учитывая евроинтеграционные тенденции Украины, разработка сухих очищенных PPD-туберкулинов согласно требованиям Директивы Совета ЕС № 97/12/ЕС (с использованием штаммов *M. bovis* «AN5» и «Valle») является для Украины актуальной. В статье приведены результаты изучения биологических свойств указанных штаммов.

Biological properties of strains of *M. bovis* «Valle» and «AN5» in the manufacture of tuberculin PPD-mammalian EU requirements. V.U. Kassich, V.G. Skrypnik, A.V. Skrypnik, V.A. Ushkalov

In accordance with 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. ○