

В.О. Головка, д.вет.н., професор, академік НААН України

О.В. Кассіч, аспірант, Харківська державна зооветеринарна академія

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

К. Ю. Колеснікова, к.вет.н., начальник цеху, ДП Херсонська біологічна фабрика

В. Г. Кошельнік, лікар ветеринарної медицини, директор, ДП Херсонська біологічна фабрика

*Боротьба з туберкульозом тварин базується на систематичних алергічних дослідженнях всього поголів'я великої рогатої худоби починаючи з сорокаденного віку з подальшими патолого-анатомічними та лабораторними дослідженнями позитивно реагуючих на ППД-туберкулін для ссавців тварин. У відповідності із стандартом ЄС PPD-туберкулін для ссавців повинен виготовлятися зі штамів *M. bovis* «AN5» або «Valle». Тому розробка вітчизняного очищеного PPD-туберкуліну із штаму *M. bovis* «Valle» КМІЕВ-9К є актуальним завданням. Визначення масової частки білка у стандартному розчині туберкуліну проводили за методом К'ельдаля. Результати проведених досліджень свідчать, що штам *M. bovis* «Valle» КМІЕВ-9К є високопротеїногенним і може бути використаним при виробництві ППД-туберкуліну для ссавців.*

Ключові слова: туберкульоз, туберкулін, мікобактерії *M. bovis* Valle.

Постановка проблеми у загальному вигляді. Боротьба з туберкульозом тварин базується на 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, якими є діагностичні алергени: ППД-туберкуліни для ссавців та птиці [1-21]. Алергічне дослідження із застосуванням ППД-туберкуліну для ссавців є основним методом прижиттєвої діагностики туберкульозу [1-3]. 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.), впроваджені у виробництво, виготовляються Сумською біологічною фабрикою і забезпечують проведення планових діагностичних досліджень на туберкульоз на території України [3, 7, 10, 15-21].

У відповідності з Директивою Ради ЄС за номером 97/12/ЄС від 17 березня 1997р., яка вносить зміни і модернізує Директиву № 64/432/ЄС [12, 17-21] для туберкулінізації тварин слід використовувати туберкулінів PPD (Protein-purified derivative) або HCSM (Heat-concentrated synthetic-medium tuberculin). Згідно стандарту ЄС, що надає Institute voor Dierhouderijen Diergezondheid (ID-DLO), Lelystad, The Netherlands, PPD-туберкулін для ссавців повинен мати ефективність 50 000 ЕСТ/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», а штам «Valle» відіграє роль резервного [3, 7, 12]. Тому розробка вітчизняного сухого очищеного PPD-туберкуліну з штамів *M. bovis* «AN5» або «Valle» є актуальним завданням [7, 12].

Постановка завдання. Метою нашої роботи було вивчення здатності до продукції туберкулопротеїнів (протеїногенних властивостей) штаму *M. bovis* Valle КМІЕВ-9К з перспективою створення на його основі вітчизняного препарату для алергічної діагностики туберкульозу тварин, що відповідає вимогам ЄС.

Матеріали і методи досліджень. З культурального фільтрату збудника туберкульозу бичачого виду штаму *M. bovis* Valle КМІЕВ-9К виготовили дослідну серію туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців у стандартному розчині. Культуру мікобактерій вирощували на рідкому синтетичному живильному середовищі (Сотона КФ) для прискореного накопичення бактеріальної маси мікобактерій [10].

Препарат одержували 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 сірчаноокислого амонію, очищення від солей за допомогою діалізу з подальшим визначенням концентрації протеїну в 1 см³ розчину [3, 4, 5, 6, 17].

Визначення масової частки білка у стандартному розчині туберкуліну проводили за методом К'ельдаля. Для цього використовували такі прилади та реактиви: колбу К'ельдаля ємністю 50 см³ за ГОСТ 25336; прилад перегінний К'ельдаля; холодильник; шафу сушильну з температурою нагрівання до 110° С; ваги лабораторні не нижче 2-го класу точності; елемент нагрівання (електроплитка) за ГОСТ 14919; піпетки градуйо-

вані за ГОСТ 29228; бюретки за ГОСТ 29252; колби Ерлеймейера ємністю 2-5 см³; крапельницю; папір лакмусовий; фільтри паперові незолоні; кислоту сірчану за ГОСТ 4204 концентровану, щільністю 1,84 г/см³ 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.

Результати власних досліджень та їх аналіз. Випробування проводили таким чином. В пробірку вносили 2 см³ одержаного з штаму *M. bovis*Valle KMIEB-9K розчину туберкулопротеїну (туберкуліну). В пробірку з 2 см³ розчину туберкуліну вносили 2 см³ 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 незолоний 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-туберкулопротеїном одержаним з штаму *M. bovis*Valle KMIEB-9K висушували на повітрі, потім розміщували у колбі К'ельдаля, додавали 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 колби К'ельдаля переносили у колбу 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 колбу Ерлеймейера наливали 20см³ розчину сірчаної кислоти 0,05 моль/дм³ і 10-15 крапель індикатора Таширо. Індикатор Таширо готували шляхом змішування у рівних об'ємах спиртового розчину метиленового червоного з масо-

вою часткою 0,2 % і спиртового розчину метиленової синьки з масовою часткою 0,1 %.

Відгінну колбу з'єднували з холодильником та пароутворювачем. Вміст колби 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 приймальній колбі накопичувалось 20 см³ розчину. Завершення відгону перевіряли лакмусовим папером.

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

Одночасно визначали масову частку азоту в незолоному фільтрі.

Масову концентрацію білка в мг/см³ (X) у одержаній пробі туберкуліну, виготовленого з виробничого штаму *M. bovis*Valle (KMIEB-9K) обчислюють за формулою :

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

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;

V₁ – об'єм 0,1 моль/дм³ розчину гідроокису натрію, що витрачений на титрування проби, см³;

K₁ – 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 незолоного фільтру, см³;

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

Згідно існуючих вимог [15, 16, 17, 18], масова частка білка у туберкуліні повинна бути 0,8±0,2 мг/см³. Масова частка білка у одержаному туберкуліні (X), виготовленому з штаму *M. bovis*Valle (модифіканти KMIEB-9K) становила 0,88±0,3 мг/см³.

Висновки і перспективи подальших досліджень. Результати проведених досліджень свідчать, що штам *M. bovis*Valle KMIEB-9K здатний до продукції туберкулопротеїну на достатньо високому рівні, а тому являється перспективним 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.– 304 с.
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 / В.Ю. Кассіч. –

Харків, 2004. – 408 с.

4. Линникова М.А. Очищенный протеин дериват туберкули на / Линникова М.А. // Проблемы туберкулеза. – 1939. – № 12. – С. 3-12.

5. Говоров А.М. Новые туберкулины / А.М. Говоров, Ф.И. Осташко. – Науч.-тех. бюллетень УНИ-ИЭВ. – 1956. – С.12-15.

6. Кассіч Ю.Я. Високоєфективний вітчизняний туберкулін / Ю.Я.Кассіч, В.Ю Кассіч., П.М.Тихонов, В.М. Горжеєв. – 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. Волосянюк, 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 / В.М. Безгин. – 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., Ничеева 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 України на корисну модель №63246 /Синтетичне живильне середовище (Сотона КФ) для прискороеного накопичення бактеріальної маси мікобактерій / Кассіч В.Ю., Кассіч О.В., Фотіна Т.І., Фотіна Г.А., Дзюба В.М., Полоз І.М.; Суми,СНАУ. – №u2011014606; заявл. 06.12.10; опубл.10.10.11, Бюл. № 19.

11. Лысенко А.П. Антигены *Mycobacterium Bovis* и атипичных микобактерий,изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота: дис...доктора.вет.наук: 16.00.03 / Лысенко Александр Петрович. – 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. Радчук И.А. Ветеринарная микробиология и иммунология / Радчук И.А., Дунаев Г.В., Колычев Н.М. – 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.

17. Кассіч В.Ю. Протеїногенні властивості штамів *M. bovisValle ma «AN5»*. / В.Ю. Кассіч, Г.І. Ребенко, В.Г.Скрипник, В.О.Ушкалов, А.В.Скрипник, А.А. Замазій // Науковий вісник ветеринарної медицини. – Вип.12 (107) // Біла Церква. – 2013 – С. 26-29.

18. Кассіч В.Ю. Протеїногенність виробничих штамів для виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців / В.Ю. Кассіч, М.Д Камбур, В.О. Ушкалов, А.А Замазій, О.В. Волосянюк // Вісник Сумського НАУ. – Вип. 1 (34). – Суми. – 2014. – С.140-143.

19. Кассіч В.Ю. Розробка та впровадження у виробництво алергенів для діагностики туберкульозу ссавців та птиці / Кассіч В.Ю. // Вісник СНАУ. – Вип. 9/2 (22). – Суми. – 2008. – С. 30-33.

20. Кассіч В.Ю. Розробка технології промислового виготовлення алергену з атипичних мікобактерій (ААМ) / В.Ю.Кассіч, Ю.Я.Кассіч. // Вісник СНАУ. – Вип. 2 (18). – Суми. – 2007. – С. 66-69.

21. Кассіч В.Ю. Біологічні властивості штамів *M. bovisValle ma «AN5»* при виготовленні PPD-туберкуліну для ссавців згідно з вимогами ЄС / В.Ю. Кассіч, В.Г. Скрипник, А.В. Скрипник, В.О. Ушкалов // Ветеринарна медицина України. – № 6 (208). – 2013. – С.18-20.

Головко В.А., Кассич О.В., Кассич В.Ю., Колесникова Е.Ю., Кошельник В.Г. Продукция туберкулопротеинов производственным штаммом *M. bovis Valle KMIEB-9K*

*Борьба с туберкулезом животных базируется на систематических аллергических исследованиях всего поголовья крупного рогатого скота начиная с сорокодневного возраста с дальнейшими патологоанатомическими и лабораторными исследованиями положительно реагирующих на ППД-туберкулин для млекопитающих животных. В соответствии со стандартом ЕС PPD-туберкулин для млекопитающих должен изготавливаться из штаммов *M. Bovis «AN5»* или «Valle». Поэтому разработка отечественного очищенного PPD-туберкулина из штамма *M. bovis «Valle» KMIEB-9K* является актуальной задачей. Определение массовой доли белка в стандартном растворе туберкулина проводили методом Кельдаля. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что штамм *M. bovis «Valle» KMIEB-9K* является высокопротеиногенным и*

может использоваться при производстве ППД-туберкулина для млекопитающих.

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

Holovko V.A., Kassich O.V., Kassich V.U., Kolesnikova K.U., Koshelnik V.H. Tuberculo-protein production of the strain *M. bovis* Valle KMIEV-9K

The main method of aftermortem diagnosis of tuberculosis in animals is the allergic test with the use of PPD-tuberculin for mammals. Preparations for the allergic testing of tuberculosis in animals and birds, including "Tuberculin purified (PPD) for mammals in a standard solution" (TUU 24.00497087.645-2001). They are manufactured by Sumy Biological Factory and used during planned diagnostic tests for tuberculosis in Ukraine. However, it should be noted that the legislative act applied by member countries of the European Union is the Council Directive 97/12/EU from 17th March 1997. According to this document, intravital allergic studies in animals are conducted using tuberculin PPD (Protein purified derivative) or HCSM (Heat-concentrated synthetic-medium tuberculin). According to the EU standards, which were provided by the Institute voor Dierhouderij en Diergenzondheid (ID-DLO), Lelistad, the Netherlands, PPD mammalian tuberculin must have the efficiency of 50 000 CTU/ml and be produced from *M. bovis* AN5 or Valle strains. At the same time "Tuberculin purified (PPD) for mammals in standard solution" TUU 24.00497087.645-2001, produced from «*M. bovis* IECVM-1» strain is used in the similar testing in Ukraine. Therefore the development of national dry purified tuberculin PPD from *M. bovis* «AN5» or «Valle» strains is an urgent task. That is why, the aim of our work was to study the proteinogenic properties of *M. bovis* Valle (modified KMIEV-9K) production strains with further development of national preparations for the allergic diagnosis of tuberculosis in animals that meet the EU requirements. The test series of the purified tuberculin (PPD) for mammals in the standard solution were prepared from the culture filtrate of bovine tuberculosis causative agent *M. bovis*, Valle KMIEV-9K strain, grown in a Sauton's liquid synthetic culture medium. The PPD was obtained by autoclaving (100°C for 3 hours) and separation of bacterial mass; obtaining and sterilization of cultural filtrates (sterilizing filtration); precipitation of protein with trichloroacetic acid solution; reprecipitation with saturated solution of ammonium sulfate; removal of salts through dialysis followed by determining the concentration of protein in 1 cm³ of solution. Determination of the protein mass fraction in a standard tuberculin solution was performed by Kjeldahl method. According to current requirements, the protein mass fraction in tuberculin must be 0,8±0,2 mg/cm³. The mass fraction of protein in the tuberculin series (X) produced from *M. bovis* Valle (modified KMIEV-9K) strain was 0,88±0,3 mg/cm³. Thus, the results of this study show that *M. bovis* Valle (modified KSP) and AN5 strains are technological, highly proteinogenic and can be used for the development, production and implementation as a national tuberculin PPD for mammals, which will meet the EU requirements.

Keywords: tuberculosis, tuberculin, mycobacterium *M. bovis* «Valle».

Дата надходження до редакції: 12.03.2015 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Березовський А.В.

УДК637.075:579.22

ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ БАКТЕРІЙ *CRONOBACTER SPP.* (SAKAZAKII) МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

О.М. Бергілевич, д.вет.н., професор, Сумський національний аграрний університет

В.О. Ушкалов, д.вет.н., професор, чл.-кор. НААН України, завідувач Національного центру штамів мікроорганізмів, Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ)

В.В. Касянчук, д.вет.н., професор, Сумський національний аграрний університет

О.М. Дерябін, завідувач відділу молекулярної біології і імунохімії, Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ)

Є.А. Гришина, аспірант, Сумський національний аграрний університет

В статті наведено результати досліджень, які вперше проведені в Україні щодо можливості ідентифікації бактерій *Cronobacter spp.* (*sakazakii*) методом полімеразної ланцюгової реакції, з використанням гену 16SrRNA. Ізоляти бактерій *Cronobacter spp.* (*sakazakii*) були виділені з сирого молока та об'єктів молочних ферм Сумської області. Серед виділених ізолятів, було вибрано 25 які мали подібні морфологічні, культуральні та біохімічні властивості для проведення ПЛР. В результаті проведеного пошуку та аналізу послідовностей генів з консервативними та варіабельними ділянками у бактерій *Cronobacter spp.* (*sakazakii*), були розроблені кілька пар олігонуклеотидних праймерів, специфічних різним ділянкам гена 16SrRNA. При використанні цих праймерів в ПЛР з ДНК виділених ізолятів були отримані попередні позитивні результати з 20 ізолятами бактерій *Cronobacter spp.* (*sakazakii*)

Вісник Сумського національного аграрного університету

Серія «Ветеринарна медицина», випуск 7 (37), 2015