

УДК 619:616:98:579.873.21:631.153.7

**ВДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИГОТОВЛЕННЯ
ППД-ТУБЕРКУЛІНУ ДЛЯ ССАВЦІВ**

КАСІЧ В. Ю.¹, ЛЕВЧЕНКО А. Г.², КАСІЧ О. В.³

¹Сумський Національний аграрний Університет, ²Одеський державний аграрний університет, ³Харківська державна зооветеринарна академія.

У роботі узагальнені результати досліджень щодо розробки «ППД-туберкулін для ссавців очищений». Розроблено нові технологічні прийоми виготовлення ППД-туберкуліну з використанням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування, що дозволило отримати високоактивний та специфічний алерген.

Ключові слова: туберкульоз, мікобактерії, ППД-туберкулін, мікрофільтрація, ультрацентрифугування.

Вступ. Серед зоонозних захворювань туберкульоз за своїм соціальним, економічним епізоотологічним та епідеміологічним значенням займає особливе місце [1 – 3]. Туберкульоз тварин спричиняє значні економічні збитки сільському господарству 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 хворобою має не тільки економічне, але й соціально-гігієнічне та епідеміологічне значення [7 – 9].

Документи МЕБ та ЄС в якості основного методу для виявлення заражених туберкульозом тварин передбачають тест на наявність гіперчутливості сповільненого типу – туберкулінову пробу. В Україні для його проведення державним підприємством – Сумська біологічна фабрика виготовляється туберкулін очищений (ППД) для ссавців, розроблений та вдосконалений фахівцями лабораторії туберкульозу ННЦ ІЕКВМ НААН України (Ю. Я. Кассіч, А. І. Загородній, П. М. Тихонов, В. Ю. Кассіч, В. В. Доценко, 2001, 2003; Дегтярьов І. М. з співав., 2006, 2009), який виготовляють з використанням виробничого штаму *M. bovis* ІЕКВМ-1 [4, 7, 8]. Під час виготовлення ППД-туберкуліну найбільш вразливою ланкою технологічного процесу є глибинна стерилізуюча фільтрація через азбестові фільтри. Їх застосування не дозволяє одержати гарантовано стерильний препарат. Крім того, використання глибинних фільтрів призводить до значних втрат білку, що знижує вихід препарату [4, 6]. Впровадження мембранних методів в технологію виготовлення ППД туберкуліну дозволяє підвищити екологічну безпеку виробництва за рахунок виключення з технології азбестових фільтрів, знизити використання води та втрати туберкулопротеїну (Шевырев Н. С. з співав., 1999, 2006; Безгин В. М. з співав., 1999, 2006, 2012, та ін.).

Перелічені факти переконливо свідчать, що тваринництво України за поголів'я великої рогатої худоби близько 4 млн. голів потребує щорічного виготовлення та використання значної кількості високоактивного та специфічного ППД-туберкуліну для ссавців, який відповідає вимогам Європейського співтовариства і забезпечує якісне та ефективне алергічне дослідження худоби на туберкульоз (за 2016 рік проведено 3,4 млн. алергічних досліджень на туберкульоз). Тому, актуальним та перспективним для тваринництва і 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 ультрацентрифугування, розробка нових та оптимізація і гармонізація існуючих вітчизняних алергенів у відповідності з вимогами ЄС [8, 9].

Матеріали і методи дослідження. Під час виконання роботи використовували електронномікроскопічні, бактеріологічні, радіологічні, імунологічні, молекулярно-генетичні, хімічні, біохімічні, статистичні, біотехнологічні методи: культивування мікобактерій, їх інактивація, виділення протеїнів, очищення шляхом діалізу, методи мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування [4, 6].

Результати дослідження. 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 разом із штамом AN-5 рекомендує Директива Ради ЄС 97/12 від 17 березня 1997 р. в якості виробних при виготовленні ППД-туберкуліну для ссавців.

Поставлене завдання вирішували шляхом того, що одержаний нами в рамках творчого обміну з РУП «ІЕВ» ім. С. Н. Вишелеського (м. Мінськ) сублімований штам збудника туберкульозу бичачого виду, який згідно з «паспорту штаму» має назву «*M. bovis Vallee* КМІЕВ-9» розконсервували та адаптували до поживних середовищ Павловського, Левенштейна-Іенсена, ІЕКВМ, Сотона КФ та Сотона ХБ [1 – 3].

Під час культивуванні штаму збудника туберкульозу бичачого виду *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 на «Живильному середовищі Сотона КФ для прискореного накопичення бактеріальної маси» [9] було відзначене прискорення росту мікобактерій і підвищення накопичення бактеріальної маси у порівнянні з середовищем Сотона за класичним прописом. Появу первинного росту культури виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 спостерігали на $(3,0 \pm 0,1)$ доби раніше; формування суцільного росту (мікробної плівки) – на $(6,0 \pm 0,3)$ діб раніше. Вихід бактеріальної маси був на $(7,4 \pm 0,3)$ мг більшим. Тобто середовище Сотона КФ мало стимулюючі ріст мікобактерій, а також селективні властивості, що призвело до отримання штаму з прискореним ростом мікобактерій. Відібраному шляхом селекції ізоляту мікобактерій з прискореним ростом після ретельного вивчення його культуральних, морфологічних та біологічних властивостей присвоїли назву: «виробничий штам збудника туберкульозу бичачого виду *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ» [1, 2, 5]. Після пересіву на виробниче синтетичне середовище Сотона ХБ [7] феномен прискорення росту зберігається впродовж 2 – 3 генерацій і надалі втрачається. Отже, надбані властивості до прискореного росту є наслідком фенотипової модифікації, а не мутаційних змін на рівні геному (не успадковуються). Одержаний штам являє собою фенотиповий модифікатор штаму збудника туберкульозу бичачого виду *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 [1, 2].

При дослідженні електронномікроскопічних препаратів з культур виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ відзначали, що мікобактерії мають вигляд коротких або помірно довгих паличок, розташованих у вигляді скупчень, конгломератів. Відзначали поліморфізм мікроорганізмів [5, 7].

Чисті культури першої та подальших генерацій штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ на середовищі Сотона КФ та Сотона ХБ в мазках, пофарбованих за Ціль-Нільсеном мають вигляд червоного кольору паличок. На МПА та МПБ не ростуть; ростуть на яєчних та картопляних живильних середовищах тільки за $37\text{ }^\circ\text{C}$. Колонії культур сухі, дрібні, кольору слонової кістки. Швидкість росту в субкультурі 10 – 20 діб. На поверхні рідких живильних середовищ утворюють крихкувату плівку, без помутніння середовища [1, 2, 6].

Під час 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. Визначали терміни початку первинного, суцільного росту та вагу накопиченої бактеріальної маси виробничих штамів (Таблиця 1): культура *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ починала рости раніше на $(2,0 \pm 0,1)$ доби, давала більше на $(6,0 \pm 0,1)$ мг

накопичення бактеріальної маси. Мікробна плівка формувалась на $(4,5 \pm 0,2)$ доби раніше, у порівнянні з вихідним штамом *M. bovis Vallee* КМІЕВ – 9.

Таблиця 1

Визначення термінів початку первинного та суцільного росту (формування мікробної плівки) та ваги накопиченої бактеріальної маси

Дослід 1	Дослід 2
Штам <i>M. bovis Vallee</i> КМІЕВ-9	Штам <i>M. bovis Vallee</i> КМІЕВ-9КМ
Термін початку первинного росту (через-діб)	
10,0±1,0	8,0±1,0
Термін формування мікробної плівки (через-діб)	
19,5±3,0	15,0±0,9
Вага накопиченої бактеріальної маси (мг)	
59,5±0,3	65,5±0,2

Таким чином, використання виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ дозволяє прискорити ріст і підвищити накопичення бактеріальної маси мікобактерій з одного флакону з $(59,5 \pm 3,5)$ до $(65,5 \pm 0,2)$ мг – на $(6,0)$ мг і дає можливість прискорити технологічний процес та збільшити вихід туберкуліну.

Результати досліджень використані під час депонування у депозитарії ДНКІБШМ виробничих штамів в Депозитарії ДНКІБШМ. Одержані свідоцтва про первісне депонування виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 за № 538 та виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ за № 539. Обидва штами можуть використовуватись для виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців.

Основою для виготовлення очищених (ППД) туберкулінів для ссавців та птиці і алергенів із атипових мікобактерій (КАМ, ААМ) є протеїни мікобактерій, які містяться у фільтратах культур. Принцип отримання очищеного деривату туберкулопротеїну (*Purified Protein Derivativ – PPD*) з культурального фільтрату мікобактерій, культивованих на синтетичному живильному середовищі, методом осадження трихлороцтовою кислотою лишається незмінним з часу розробки технології виробництва ППД-туберкуліну *F. B. Seibert* (1934, 1949). У подальшому цей метод удосконалили М. А. Лінніковою (1959), О. М. Говоровим, Ф. І. Осташком (1952, 1956), Ю. Я. Кассічем., В. В. Білушком, А. І. Завгороднім (2004, 2006, 2011, 2014) та іншими дослідниками. Недоліком такого способу є 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.

Для уникнення означених недоліків нами запропонована технологічна схема одержання ППД-туберкуліну, що включає обробку культуральної рідини після відділення бактеріальної маси виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ методом мембранної 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* із ацетату целюлози з гетерогенним подвійним шаром завдяки вбудованій системі попередньої фільтрації, необхідній для економічності компоновки системи, при утримуючій мікробній 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.

Запропонованим нами способом протеїн з суспензії відокремлювали від рідини шляхом ультрацентрифугування за 14 тис. об/хв на промисловому високообертovому сепараторі малого об'єму (Таблиця 2).

Таблиця 2.

Вихід туберкулопротеїну та масова частка білка в ППД-туберкуліні, виготовленому за різними технологічними схемами

Характеристика дослідження	Вихід туберкулопротеїну після осадження ТХО, г	Вихід туберкулопротеїну з 1 л середовища, г	Масова частка білка, мг/см ³
Класична технологія виготовлення туберкуліну	19,8±0,2	1,4±0,3	0,8±0,1
Технологія з застосуванням мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування	28,4±0,3	2,1±0,4	1,4±0,2

Матеріали таблиці 2 свідчать, що під час використання для виготовлення туберкуліну технології з мембранною мікрофільтрацією та ультрацентрифугуванням в препараті достовірно (на 8,6±0,1) г збільшується вихід туберкулопротеїну після осадження трихлороцтовою кислотою, вихід туберкулопротеїну з 1 л середовища – на (0,7±0,1) г та масова частка білка – на (0,6±0,1) мг/см³. 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, високо очищеним, містять білкові фракції з найвищими показниками діагностичної активності і специфічності (150 – 1000 кДа), в той час як глибинна стерилізуюча фільтрація через азбестові фільтри не дозволяє одержати гарантовано стерильний препарат та призводить до втрат на таких фільтрах значної кількості білка і води.

Розроблена нами технологічна схема виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців очищеного наведена на рисунку 1.

Висновки. 1. Відібраний шляхом селекції, задепонований та впроваджений у виробництво виробничий штам *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ є високопротеїногенним, відповідає вимогам Директиви Ради ЄС 97/12 (від 17 березня 1997 р.) і використаний при виготовленні дослідно-виробничих серій ППД-туберкуліну для ссавців очищеного. Масова частка білка в пробі туберкуліну, виготовленого з штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 становить $(0,89 \pm 0,1)$ мг/см³, а в пробі туберкуліну з штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ є достовірно більшою ($p \leq 0,05$) і становить $(1,20 \pm 0,2)$ мг/см³. Використання виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ під час культивування на синтетичному живильному середовищі Сотона ХБ дозволяє прискорити ріст і накопичення та підвищити вихід бактерійної маси мікобактерій з одного флакону на $(6,0 - 7,9)$ мг і дає можливість відповідно прискорити технологічний процес та збільшити вихід туберкуліну до $(1,20 \pm 0,1)$ мг/см³.

2. При виготовленні експериментальних серій ППД-туберкуліну для ссавців очищеного розроблені нові технологічні прийоми з використанням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування, що дозволило отримати високоактивний та специфічний діагностичний алерген. При використанні технології з мембранною мікрофільтрацією та ультрацентрифугуванням в препараті достовірно збільшуються ($p \leq 0,05$) вихід протеїну після осадження ТХО на $(8,6 \pm 0,5)$ г, вихід туберкуліну з 1 л середовища на $(0,7 \pm 0,1)$ г та масова частка білка на $(0,6 \pm 0,1)$ мг/см³. Препарат виходить стерильним та високоочищеним. Після мікрофільтрації на ультрафільтраційних мембранних фільтрах *Sartoclean*[®] SA 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.

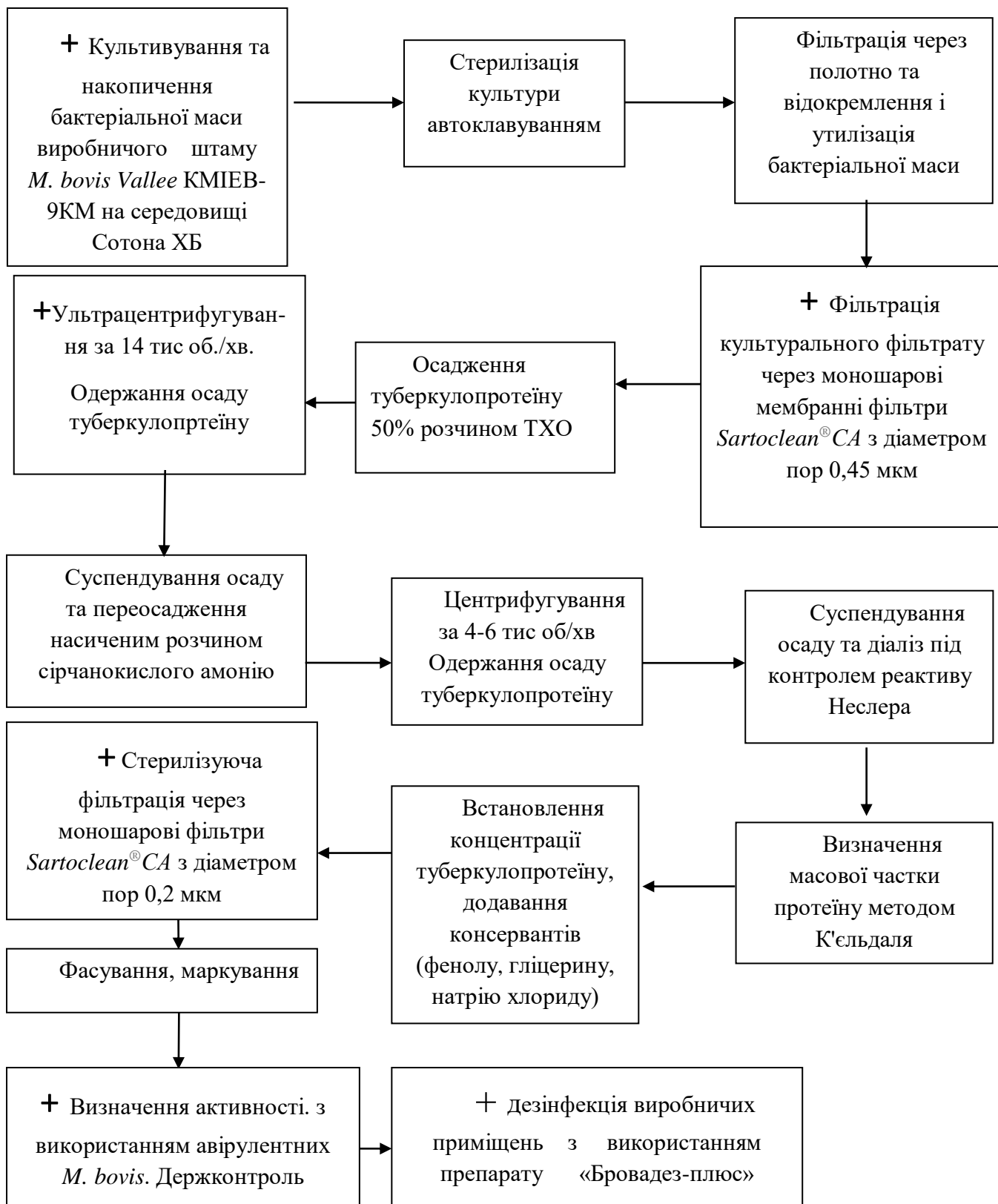


Рис. 1. Технологічна схема одержання ППД-туберкуліну для ссавців очищеного. Позначкою «+» помічені модифіковані технологічні операції.

Список літератури

1. Головка В. О. Вивчення властивостей виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЭВ – 9 КМ / 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, Серія «Ветеринарна медицина». – 2016. – Випуск 6/38. – С. 119–124.
3. Головка В. О. Продукція туберкулопротеїнів виробничим штамом *M. bovis Vallee* КМІЭВ-9 КМ / 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. Том 52, Вып. 1. – С. 38–42.
5. Кассіч В. Ю. Алергічна діагностика зоонозів та засоби для її проведення / В. Ю. Кассіч, А. Г. Левченко, В. Д. вченко, О. В. Кассіч, В. О. Головка // Вісник Сумського національного аграрного університету. – 2016. – Вип. 1 (40). – С. 164–169.
6. Кассіч В. Ю. 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. – Випуск 11 (39). – С. 100–106.
7. Левченко А. Г. Модифицированная методика подготовки производственного штамма *M. bovis «Vallee»* КМІЭВ-9 КМ для исследований растровым электронным микроскопом / А. Г. Левченко, А. В. Кассіч // Учреждение образования «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия». – Молодежь и инновации – 2017 В двух частях. – 2017. – Часть 2. – С. 105–107.
8. Патент на корисну модель «Виробничий штам *M. bovis Vallee* КМІЭВ-9КМ для виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців» за № 109231, виданий згідно заявки № 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 заявки у 2017 08588 «Спосіб виготовлення ППД-туберкуліну з використанням методів мікрофільтрації та ультрацентрифугування» Розробники: К. Ю. Колеснікова, О. В. Кассіч, В. Ю. Кассіч, В. Г. Кошельник, Т. О. Терпецька.

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ СХЕМЫ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ППД-ТУБЕРКУЛИНА ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. КАССИЧ В. Ю., ЛЕВЧЕНКО А. Г., КАССИЧ А. В.

В работе обобщены результаты исследований по разработке препарата «ППД-туберкулин для млекопитающих очищенный». Разработаны новые технологические приемы изготовления ППД-туберкулина с использованием методов микрофльтрации и ультрацентрифугирования, что позволило получить активный и специфический аллерген.

Ключевые слова: туберкулез, микобактерии, ППД-туберкулин, мембранная микрофльтрация, ультрацентрифугирование.

IMPROVEMENT OF THE PROCESS FLOW DIAGRAM OF PPD-TUBERCULIN PRODUCTION FOR MAMMALS. KASSICH V. YU., LEVCHENKO A.G., KASSICH O. V.

Results on development of “ PPD Tuberculin Mammalian purified ” preparation are summarized. New technological approaches for “ PPD Tuberculin Mammalian purified ” preparation by

microfiltration and ultracentrifugation methods are developed. It allow us to receive active and specific allergen.

Key words: *tuberculosis, mycobacterium, PPD-tuberculin, microfiltration, ultracentrifugation.*