

АЛЕРГІЧНА ДІАГНОСТИКА ЗООНОЗІВ ТА ЗАСОБИ ДЛЯ ЇЇ ПРОВЕДЕННЯ

Кассіч В. Ю.

Левченко А. Г.

Івченко В. Д.

Сумський національний аграрний університет

Кассіч О. В.

Головко В. А.

Харківська Державна зооветкакадемія

*Алергічні дослідження є основним методом прижиттєвої діагностики небезпечних зооантропонозів: туберкульозу, бруцельозу і сипу. Біологічною промисловістю України засоби алергічної діагностики сипу та бруцельозу не виробляються. Для алергічних досліджень на туберкульоз в Україні використовують туберкуліни очищені (ППД) для ссавців та птиці та алерген з атипових мікобактерій ААМ, виготовлені державним підприємством – Сумська біологічна фабрика. Актуальним напрямком досліджень є вдосконалення та стандартизація вітчизняних ППД-туберкулінів у відповідності до вимог ЄС, у зв'язку з чим на державному підприємстві – Херсонська біологічна фабрика розроблено та впроваджено у виробництво ППД-туберкулін для ссавців, виготовлений з використанням виробничого штаму *M. Bovis* «Valle» КМІЕВ-9 КМ та методів мікрофільтрації та ультрацентрифугування.*

Ключові слова: *мікобактерії, збудник туберкульозу, туберкулін, алергія, гіперчутливість сповільненого типу (ГЧСТ), живильні середовища, виробничі штами.*

Постановка проблеми у загальному вигляді. Алергічні дослідження є основним методом прижиттєвої діагностики ряду інфекційних хвороб. Для алергічних досліджень на туберкульоз в Україні використовують туберкуліни очищені (ППД) для ссавців та птиці та алерген з атипових мікобактерій ААМ [1, 2]. Ці препарати виготовляє Сумська державна біологічна фабрика. Проте слід враховувати той факт, що при торгівлі тваринами між країнами Європейського співтовариства законодавчим актом є Директива Ради ЄС 97/12 від 17 березня 1997 р., згідно з якою туберкулінізацію тварин проводять з використанням туберкулінів PPD або HCSM, які повинні виготовлятися з штамів *M. bovis* «AN5» або «Valle» [3]. Тому, на сьогоднішній день актуальним напрямком досліджень є стандартизація вітчизняних ППД-туберкулінів у відповідності до вимог ЄС.

Мета роботи. Метою роботи є порівняльний аналіз різних технологічних прийомів при виготовленні ППД-сенситинів та визначення перспектив подальших досліджень для вдосконалення вітчизняних препаратів для алергічної діагностики.

Аналіз публікацій та результатів власних досліджень. Під алергією розуміємо специфічну зміну реактивності організму по відношенню до речовини або збудника, яка виникає за умов гомологічної сенсибілізації і полягає у підвищенні місцевої або загальної чутливості організму до повторного впливу того ж агенту.

Алергія являється імунологічним феноменом, захисною реакцією організму, спрямованою на знищення антигену. Класичним прикладом алергічної реакції вважається туберкулінова проба. До реакцій туберкулінового типу відносять аналогічні прояви при сапі, бруцельозі, туляремії, антраксі, стафілококозах, віспі, токсоплазмозі, бластомікозі, лейшманіозі, ехінококозі, інфекційному ринотрахеїті, лейкозі та деяких інших інфекційних та інвазійних захворюваннях.

Інфекційна алергія – стан підвищеної чутливості організму до введення збудника певної хвороби або продуктів його життєдіяльності. Настає інфекційна алергія через 2 – 3 тижні після зараження і найбільше виражена при туберкульозі, бруцельозі, сапі, туляремії для яких характерний хронічний перебіг та розвиток нестерильного імунітету. Стан інфекційної алергії використовують для прижиттєвої діагностики згаданих хвороб [1, 2, 4 – 6].

Термін «алергія» широко розповсюджений, проте часто використовується у невірному сенсі. Туберкулінові, малеїнові та інші подібні реакції по суті не є проявом алергії, оскільки алергічні реакції являють собою реакції миттєвого типу та обумовлені активацією В-систем лімфоцитів, розмноженням плазматичних клітин і продукцією специфічних антитіл. Реакції на туберкулін і малеїн являють собою класичний прояв імунологічного феномену гіперчутливості сповільненого типу (ГЧЗТ). ГЧЗТ є фактором клітинного імунітету. Реакція характеризується взаємодією сенсибілізованих лімфоцитів з антигенами мікробної клітини та виділенням медіаторів клітинного імунітету – лімфокининів, яких відомо близько 100.

Алергенами у широкому сенсі можуть бути різні речовини – від високомолекулярних до простих. Алергени, що використовують для діагностики інфекційних хвороб, являють собою фільтрати культур збудників відповідних хвороб, зависі інактивованих культур або екстракти з них. Діагностичні дослідження з використанням алергенів та феномену ГЧЗТ називають алергічними [1, 2, 4 – 7].

Проведення алергічних досліджень стало можливим після розробки альттуберкуліну, про виготовлення якого сповістив у 1891 році Р. Кох. Вперше цей препарат був розроблений російським вченим Х. І. Гельманом (1888), але результати його досліджень були опубліковані дещо пізніше. У 1890 р. у Варшаві О. Ф. Буйвидпочав виготовлення цього

алергену і назвав його туберкуліном. Для діагностики туберкульозу у домашніх тварин туберкулін був вперше застосований у 1891 р. В. Г. Гутманом [1, 2, 4 – 7].

Для діагностики сапу в 1891 р. Х.І. Гельман та О.К.Кальнінг запропонували малеїн. Малеїн являє собою фільтрат інактивованої нагріванням бульйонної культури збудника сапу. Для його отримання використовують високовірулентну культуру *Pseudomonas mallei*, вирощену на гліцериновому МПБ впродовж 4 місяців. Культуру стерилізують, відстоюють 2 місяці для екстракції та посвітління й розфасовують.

Для діагностики бруцельозу у 1968 р. А. Н. Касьяновим та Е. С. Орловим був розроблений бруцелін. Бруцелін являє собою комплекс специфічних білкових речовин, виділених з бруцел.

Специфічні алергени (сенситини) вводять внутрішньошкірно, підшкірно, внутрішньовенно, внутрішньочеревно, інтрапальпебрально, в хвостову складку, наносять на кон'юнктиву ока [1, 2, 4 – 7].

До початку 80-х років 20 сторіччя для алергічної діагностики туберкульозу використовували туберкулін Коха (альттуберкулін). Недоліком алттуберкуліну є наявність у ньому залишків поживного середовища, які сприяють прояві неспецифічної алергії [1, 4 – 7].

Для прижиттєвої діагностики туберкульозу тварин та птиці застосовують сухі очищені (ППД) туберкуліни для ссавців та птиці, а також алергени з атипових мікобактерій: КАМ (виробництва Курської біофабрики) або ААМ, що виготовляє Сумська біологічна фабрика (ці препарати є аналогами).

Сухий очищений (ППД) туберкулін готують шляхом культивування мікобактерій туберкульозу бичачого виду на синтетичних поживних середовищах. Культури автоклавують, бактеріальну масу утилізують, у культуральний фільтрат додають трихлороцтову кислоту (ТХО) та поспіль сірчаноокислий амоній для осадження протеїнів. Одержаний осад відмивають від залишків солей методом діалізу. Отриманий таким чином препарат являє собою очищений дериват протеїну мікобактерій (Purified Protein Derivatіv – PPD) – фрагменти молекул туберкулопротеїну. Випускають препарат у ліофілізованому виді або в стандартному розчині. Введення препарату не спричиняє сенсibilізації організму тварин.

Протеїни мікобактерій, що містяться у фільтратах культур, являються основою для виготовлення очищених туберкулінів для ссавців, птиці та алергенів з атипових мікобактерій (КАМ, ААМ). Принцип отримання очищеного деривата туберкулопротеїну (PPD) з культурального фільтрату мікобактерій, вирощених на синтетичних живильних середовищах, методом осадження трихлороцтовою кислотою (ТХО) лишається незмінним з часів розробки технології виробництва ППД-туберкуліну F. B. Seibert. У подальшому цей

метод удосконалений М. А. Лінніковою, О. М. Говоровим, Ф. І. Осташко та іншими дослідниками [1, 2, 4 – 6].

Туберкуліни типу ППД були виготовлені для використання у гуманній медицині, а також для ссавців та для птиці. Так, Ф. І. Осташко запропонував туберкулін (Т-УІЕВ), одержаний осадженням культурального фільтрату збудника туберкульозу три хлороцтовою кислотою або сірчаноокислим амонієм. На думку автора, речовина, що спричиняє алергічну відповідь, являє собою не цілу молекулу туберкулопротеїну, а продукт її гідролізу (дериват) [8 – 11].

Впродовж тривалого часу туберкуліни готували з трьох штамів збудника туберкульозу бичачого та двох людського виду. У зв'язку з тим, що моноалергени мають вищу активність та специфічність, сьогодні при виготовленні туберкуліну для ссавців використовують штамми тільки одного бичачого виду [1, 2, 4, 5].

А. М. Шаровим, В.М. Безгиним, Н.С. Шевиревим, О. О. Конаревим зі співавт. розроблені та вдосконалені промислові технології виробництва біопрепаратів для алергічної діагностики туберкульозу [10, 11].

Сучасна технологічна схема виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців, птиці і моноалергенів, що входять до складу алергену з атипових мікобактерій, передбачає культивування на рідкому синтетичному живильному середовищі виробничого штаму збудника туберкульозу або атипових мікобактерій (Рис. 1, Рис. 2), стерилізацію бактеріальної маси, одержання з неї та стерилізацію культуральних фільтратів, осадження протеїну розчином трихлороцтової кислоти (Рис. 3, Рис. 4), переосадження його насиченим розчином сірчаноокислого амонію, очищення від солей за допомогою діалізу з подальшим визначенням концентрації протеїну, вміст якого може коливатися в межах $0,8 \pm 0,2$ мг/см³. Розроблені також методи отримання препарату з використанням фільтраційних установок [1, 2, 11].

А. П. Лисенко повідомляє, що в ППД-туберкуліні для ссавців специфічна активність пов'язана з фракцією протеїнів культуральної рідини *M. bovis*, с розміром молекул близько 24 кДа. Білкові фракції з молекулярною масою 90 кДа і більше мають найбільшу активність, але малу специфічність (100 % та 20 %, відповідно). Найбільш специфічною являється фракція з молекулярною масою 24 кДа (чутливість 43 %, специфічність – 100 %) [11].

Підготовка зразків бактеріальної маси мікобактерій виробничого штаму *M. Bovis* «Valle» КМІЕВ – 9 КМ для дослідження растровим електронним мікроскопом проводилася за методикою, що включала етапи фіксації глютаровим альдегідом на фосфатному буфері Мілоніга, промивки фосфатним буферним розчином, зневоднення у серії етилових спиртів зростаючої концентрації і висушування при кімнатній температурі.

Для запобігання деформації мікрорельєфу поверхні клітинних стінок мікроорганізмів і збереження просторової структури мікроплівок бактерій, зразок бактеріальної біомаси розміром близько 2x2 мм вміщували на предметне скло і проводили всі етапи підготовки крапельним методом. Об'ємне співвідношення зразка біоматеріалу до робочих розчинів складало 1:10. Глютаральдегідний фіксатор змінювали двічі. Відмивали зразки від фіксатора фосфатним буфером з рН 7,4. Зневоднення етиловим спиртом.

По закінченню зневоднення, зразки вміщували на предметний столик у краплі абсолютного спирту, висушували на повітрі.

Для надання зразкам електропровідності покривали їх поверхню металічним сріблом, шляхом напилення у вакуумі апаратом ВУП-5.

Готові зразки досліджували растровим електронним мікроскопом РЕМ-106И (Selmi).

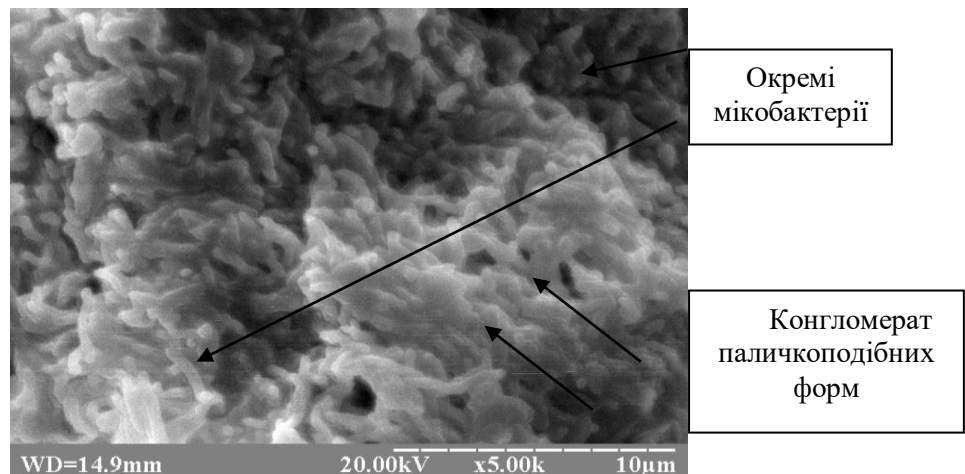


Рис. 1. Мікобактерії виробничого штаму *M. bovis* «Valle» КМІЕВ-9 КМ із середовища Сотона-ХБ. Конгломерат паличкоподібних форм. Окремі палички визначені стрілками. (РЕМ 106 И. ×5000). Фото авторів.

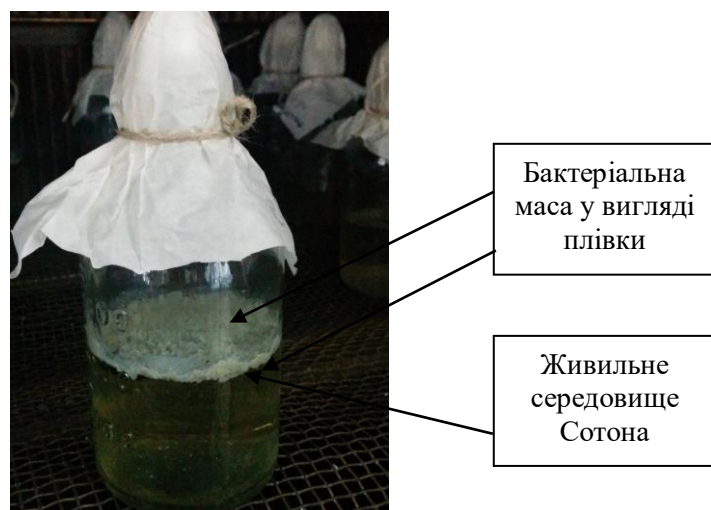


Рис. 2. Накопичена на середовищі Сотона ХБ бактеріальна маса мікобактерій виробничого штаму *M. bovis* «Valle» КМІЕВ – 9 КМ.



Рис. 3. Процес ультрафільтрації культурального фільтрату мікобактерій виробничого штаму *M. bovis* «Valle» КМІЕВ-9КМ після осадження протеїну трихлороцтовою кислотою.

Фото авторів.



Рис. 4. Зняття туберкуліну зі стінок барабану ультрацентрифуги (високообертового виробничого сепаратору) після осадження його з культурального фільтрату мікобактерій виробничого штаму *M. Bovis* «Valle» КМІЕВ – 9 КМ ТХО. Фото авторів.

При дослідженні великої рогатої худоби в Україні використовують очищений ППД туберкулін для ссавців, діагностична доза якого становить 5000 М.Е. в 0,1 см³ стандартного розчину. Дослід використання у тваринницьких господарствах України такої дози туберкуліну свідчить про її доцільність та ефективність [1, 2 – 7].

На підприємстві МЗО ЗАО «Біолек» по методиці Ліннікової до 2003 року виготовляли ППД-туберкулін для ссавців. З метою забезпечення тваринництва України препаратами для алергічної діагностики туберкульозу тварин та птиці вітчизняного виробництва колективом авторів (Кассіч Ю.Я., Кассіч В.Ю., Завгородній А.І. та ін.) на базі ІЕКВМ УААН та Сумської

біофабрики розроблені «Туберкулін очищений (ППД) для ссавців у стандартному розчині» ТУУ 24.00497087.645-2001), ППД-туберкулін для птиці и аналог комплексного алергену з атипівих мікобактерій (КАМ) – алерген з атипівих мікобактерій (ААМ) [1, 2, 6, 7]. Препарати для алергічної діагностики туберкульозу тварин та птиці впроваджені у виробництво, виготовляються Сумською біологічною фабрикою і забезпечують проведення планових діагностичних досліджень на туберкульоз на території України.

Проте, слід враховувати той факт, що при веденні торгівлі тваринами між країнами Європейського співтовариства законодавчим актом є Директива Ради ЄС 97/12 від 17 березня 1997 р, яка вносить поправки та модернізує Директиву 64/432/ЄЕС. У відповідності з цими документами туберкулінізацію тварин проводять з використанням туберкулінів PPD або HCSM. Стандарт ЄС PPD-туберкуліну для ссавців надає Institutevoor Dierhouderij en Diergezondheid (ID-DLO), Lelistad, The Netheriands. PPD-туберкулін повинен мати ефективність 50 000 ЕСТ/мл і випускатись у ліофілізованому вигляді в ампулах по 1,8 мг PPD (тобто 0,0002 мг PPD еквівалентні одній міжнародній одиниці туберкуліну). Препарат повинен виготовлятися з штамів *M. bovis* «AN5» або «Valle», в той час як при виготовленні «Туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців у стандартному розчині» ТУУ 24.00497087.645-2001, виробничим штаммом є «*M. bovis* ІЕКВМ-1» [1 – 3, 6, 7].

Висновки і перспективи подальших досліджень. Наведені вище матеріали свідчать про те, що на сьогоднішній день для ветеринарної медицини України актуальним напрямком досліджень є пошук та впровадження у виробництво нових високопротейногенних виробничих штамів *M. bovis* для виготовлення туберкулінів, розробка ефективних і високопродуктивних живильних середовищ для їх культивування, а також розробка нових і стандартизація вітчизняних алергенів у відповідності з вимогами ЄС.

Список використаної літератури:

1. Кассіч В. Ю. Мінливість мікобактерій, епізоотологічний моніторинг, заходи і засоби боротьби з туберкульозом тварин в умовах радіаційного впливу: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня док. вет. наук: спец. 16.00.03 "Ветеринарна мікробіологія і вірусологія" / В. Ю. Кассіч. – Харків, 2004.– 42 с.

2. Кассіч 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.

3. Кассіч В. Ю. Контроль якості експериментальної серії ППД-туберкуліну для савців / В. Ю. Кассіч, А. Г. Левченко, О. В. Кассіч, В. О. Головка, Т. О. Терпецька, К. Ю. Колеснікова // Вісник Сумського національного аграрного університету. – Суми, 2016. – № 11 (39) 2016. – С. 100 – 106.

4. Хоменко В. І. Контроль худоби на наявність туберкульозу в країнах-членах ЄС / В. І. Хоменко, В. Ф. Титаренко, О. М. Клименко, Ю. О. Колос // Міжнародна науково-практична конференція "Епізоотологія і профілактика інфекційних хвороб великої рогатої худоби", 14 – 17 березня 2006 року, НАУ, Київ, Україна. – Київ – 2006. – С. 42 – 43.

5. Кассич Ю. Я. Туберкулез животных и меры борьбы с ним / Кассич Ю. Я. и др. – Киев: "Урожай", 1990. – 304 с.

6. Кассич В. Ю., Жученко А. В. Гиперчувствительность замедленного типа (ГЧЗТ) и ее использование для диагностики бактериальных инфекций / В. Ю. Кассич, А. В. Жученко // Вісник Сумського НАУ – Вип. 9/1 (21). – Суми, 2008. – С. 40 – 43.

7. Кассич В. Ю. Аллергия и аллергическая диагностика инфекционных болезней / В. Ю. Кассич, Н. П. Овдиенко, О. 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. Говоров А. М. Новые туберкулины / Говоров А. М., Осташко Ф. И. // Науч.-тех. бюллетень УНИИЭВ. – 1956. – С. 12 – 15.

9. Безгин В. М. Совершенствование промышленной технологии (ППД) туберкулина и его биохимическая характеристика: Автореф. дис. канд. вет. наук: 03.00.04 – М., 1990. – 27 с.

10. 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.

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.

References:

1.

Кассич В. Ю., Левченко А. Г., Івченко В. Д., Кассич О. В., Головка В. А.

АЛЕРГІЧНА ДІАГНОСТИКА ЗООНОЗІВ ТА ЗАСОБИ ДЛЯ ЇЇ ПРОВЕДЕННЯ

Алергічні дослідження є основним методом прижиттєвої діагностики небезпечних зооантропонозів: туберкульозу, бруцельозу і сапу. Біологічною промисловістю України засоби алергічної діагностики сапу та бруцельозу не виробляються. Для алергічних

досліджень на туберкульоз в Україні використовують туберкуліни очищені (ППД) для ссавців та птиці та алерген з атипових мікобактерій ААМ, виготовлені державним підприємством – Сумська біологічна фабрика. Актуальним напрямком досліджень є вдосконалення та стандартизація вітчизняних ППД-туберкулінів у відповідності до вимог ЄС, у зв'язку з чим на державному підприємстві – Херсонська біологічна фабрика розроблено та впроваджено у виробництво ППД-туберкулін для ссавців, виготовлений з використанням виробничого штаму *M. Bovis* «Valle» КМІЕВ-9 КМ та методів мікрофільтрації та ультрацентрифування.

Ключові слова: мікобактерії, збудник туберкульозу, туберкулін, алергія, гіперчутливість сповільненого типу (ГЧСТ), живильні середовища, виробничі штами.

**Кассич В. Ю., Левченко А. Г., Ивченко В. Д., Кассич А. В., Головка В. А.
АЛЛЕРГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЗООНОЗОВ И ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЕЕ
ПРОВЕДЕНИЯ**

Аллергические исследования являются основным методом прижизненной диагностики опасных зоонозов: туберкулеза, бруцеллеза и сапа. Биопромышленностью Украины средства аллергической диагностики сапа и бруцеллеза не производятся. Актуальным направлением исследований является стандартизация отечественных ППД-туберкулинов в соответствии с требованиями ЕС.

Ключевые слова: микобактерии, возбудитель туберкулеза, туберкулин, аллергия, гиперчувствительность замедленного типа (ГЧЗТ), питательные среды, производственные штаммы.

**Allergic Diagnostics of Zoonotic Infections and Methods of its Carrying out
Kassich V. Y., Levchenko A.G., Ivchenko V.D., Kassich O.V., Golovko V.O.**

The article shows the current state of dangerous anthroozoonosis (tuberculosis, brucellosis and Malleus disease) lifetime diagnosis in Ukraine. Tuberculosis, brucellosis and Malleus disease are characterized by chronic course and by the formation of non-sterile immunity. As a result there appears an effective mean – the provocation of infection allergy as a state of body hypersensitivity to the injection of a causative agent of disease or its metabolic byproduct. Today the biological industry of Ukraine offers several means for allergic diagnosis but unfortunately medications for Malleus disease and brucellosis diagnosis are not produced.

The problem of standardization of Ukrainian means of allergic diagnosis of zoonoses in accordance with EU standards is considered.

Key words: purified tuberculin (PPD) for mammals, mycobacteria, the causative agent of tuberculosis, tuberculin, allergy, hypersensitivity of delayed type, production strains.