

## Анотація

У роботі узагальнені результати досліджень щодо вивчення епізоотичної ситуації з туберкульозу ВРХ в Україні та розробки, гармонізації з вимогами ЄС і впровадження препарату для алергічної діагностики туберкульозу тварин. Експериментальним шляхом відібрані та впроваджені у виробництво виробничі штами і технологічні прийоми виготовлення та контролю ППД-туберкуліну нового покоління. За результатами експериментальних досліджень у порівнянні з контрольними серіями препарату доведено високу протеїногенність виробничих штамів та діагностичну активність і специфічність дослідно-виробничих серій алергену.

Першим етапом роботи був підбір виробничих штамів. Для цього провели адаптацію, селекцію, дослідження морфологічних, культуральних і біологічних властивостей та депонування виробничого штаму *Mycobacterium bovis Vallee*, оскільки саме цей штам разом із штаммом *AN-5* рекомендує Директива Ради Європейського співтовариства 97/12 від 17 березня 1997 р. в якості виробничих при виготовленні ППД-туберкуліну для ссавців. Нині при виробництві цього препарату в Україні використовують штам *Mycobacterium bovis*-ІЕКВМ-1 (Кассіч Ю. Я. зі співав., 1999).

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 «*Mycobacterium bovis Vallee* КМІЕВ-9» розконсервували та адаптували до щільних елективних поживних середовищ Павловського, Левенштейна-Іенсена, ІЕКВМ, та рідких синтетичних живильних середовищ Сотона КФ та Сотона ХБ.

Для прискореного накопичення бактеріальної маси мікобактерій нами розроблене синтетичне живильне середовище Сотона КФ. Поставлене завдання вирішували шляхом заміни у складі середовища Сотона за класичним медичним прописом заліза лимоннокислого аміачного

двухвалентного на залізо сірчаноокисле ( $FeSO_4$ ) та додавання амонію лимоннокислого двохзаміщеного ( $C_6H_{14}O_7N_2$ ), цинку сірчаноокислого ( $ZnSO_4$ ) та вітамінів  $B_1$  і  $B_{12}$ . На середовищі Сотона КФ, 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 має 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». Фактично, одержаний штам являє собою фенотиповий модифікатор штаму збудника туберкульозу бичачого виду *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9. Після пересіву на виробниче синтетичне середовище Сотона ХБ феномен прискорення росту зберігається протягом 2-3 генерацій і надалі втрачається. Таким чином, надбані властивості до прискореного росту є наслідком фенотипової модифікації, а не мутаційних змін на рівні геному (не спадкуються).

Під час вивчення електронномікроскопічних препаратів з культур виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ відзначали, що мікобактерії мають вигляд коротких або помірно довгих паличок, іноді розташованих у вигляді скупчень, конгломератів. Відзначається поліморфізм мікроорганізмів. 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 штам не росте; росте на яєчних та картопляних живильних середовищах тільки за  $37^\circ C$ . Колонії культур сухі, дрібні, кольору слонової кістки. Швидкість росту в субкультурі 10-20 діб. На поверхні рідких

живильних середовищ утворює крихкувату плівку, без помутніння середовища. У подальшому визначали терміни початку росту, формування плівки (суцільного росту) та вагу накопиченої бактеріальної маси виробничих штамів. Для цього проводили культивування та накопичення бактеріальної маси мікобактерій штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 та штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ на середовищі Сотона ХБ. 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, в порівнянні з вихідним штамом *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9.

Результати досліджень використані під час депонування 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.

Наступним етапом роботи була розробка середовища для культивування виробничих штамів з метою одержання ППД-туберкуліну для ссавців. Для цього в умовах Херсонського державного підприємства – біологічна фабрика розробили середовище Сотона ХБ. За основу взяли середовище Сотона за прописом Індійської компанії *HIMEDIA*. Модифікація цього середовища полягала в додаванні до основного складу інгредієнтів вітамінів групи *B*, як факторів росту. Застосування в процесі виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців синтетичного живильного середовища Сотона ХБ забезпечило прискорення росту культур збудника туберкульозу виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ на  $(2,0 \pm 1,0)$  доби і накопичення бактерійної маси мікобактерій на  $(5,8 \pm 1,9)$  мг, що підвищує вихід кінцевого продукту (туберкуліну) з одиниці об'єму середовища.

Черговим етапом роботи була розробка та впровадження у виробництво технології виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців очищеного та виготовлення дослідно-виробничих серій препарату. Нами запропонована технологічна схема одержання ППД-туберкуліну, яка

включає обробку культуральної рідини після відділення бактеріальної маси виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ методом мембранної мікрофільтрації з використанням капсул *Sartoclean*<sup>®</sup> *CA* з діаметром пор 0,45 мкм та відділення білкових фракцій туберкуліну після осадження їх трихлороцтовою кислотою шляхом ультрацентрифугування з подальшою стерилізуючою мікрофільтрацією одержаних пермеатів через капсули *Sartoclean*<sup>®</sup> *CA* з діаметром пор 0,2 мкм.

Запропонованим нами способом протеїн з суспензії відокремлювали від рідини шляхом ультрацентрифугування за 14 тис об/хв на промисловому малооб'ємному високообертovому сепараторі або ультрацентрифузі («Сверхцентрифуга СГО-100х75» – 15 тис об / хв; або «Сверхцентрифуга ОТР-17», швидкість обертів ротора 256 тис об / хв).

Під час використання для виготовлення туберкуліну технології з мембранною мікрофільтрацією та ультрацентрифугуванням в препараті достовірно на  $(8,6 \pm 0,5)$  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  $(0,6 \pm 0,1)$  мг/см<sup>3</sup>.

За рахунок використання ультрафільтраційних мембран з пропускною здатністю 150-1000 кДа та капсул *Sartoclean*<sup>®</sup> *CA* з діаметром пор 0,45-0,2 мкм препарат виходив стерильним та високоочищеним, 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 білку та води.

Наступним етапом роботи була розробка специфічного та безпечного для здоров'я тварин і людей способу визначення активності ППД-туберкуліну для ссавців очищеного в дослідах на морських свинках і великій рогатій худобі з використанням інактивованої автоклавуванням бактеріальної маси *M. bovis*. В якості контролю використовували щеплених (сенсibilізованих) культурою вакцинного штаму БЦЖ тварин. Сенсibilізацію великої рогатої худоби і морських свинок, визначення

активності дослідно-виробничих серій у порівнянні з контрольною, визначення відсутності мікробної контамінації, інші методи контролю препарату проводили у відповідності до вимог ДСТУ 4664:2006: «Туберкулін очищений для ссавців у стандартному розчині».

Звикористанням розроблених нами та впроваджених технологічних методів і виробничих штамів в 2015 та 2016 роках на Херсонському державному підприємстві – біологічна фабрика виготовлені експериментальні дослідно-виробничі серії № 1 (Е) та № 2 (Е), ППД-туберкуліну для ссавців очищеного. У дослідях на мурчаках та здоровій великій рогатій худобі, щеплених інактивованою культурою *M. bovis Vallee*, та культурою БЦЖ визначено, що випробовувані дослідно-виробничі серії № 1 (Е) та № 2 (Е) ППД-туберкуліну для ссавців очищеного є активними та придатними для алергічного дослідження на туберкульоз. Активність серій туберкуліну № 1 (Е) та № 2 (Е) в Міжнародних одиницях (МО) становила 49000 МО/см<sup>3</sup> та 47000 МО/см<sup>3</sup>, відповідно. Встановлено, що способи визначення активності туберкуліну на щепленій інактивованою культурою *M. bovis* великій рогатій худобі та мурчаках та на щеплених вакцинним штамом БЦЖ тваринах є однаково ефективними і можуть використовуватись для проведення контролю активності ППД-туберкуліну для ссавців. Спосіб контролю активності туберкуліну на тваринах, щеплених інактивованою бактеріальною масою *M. bovis Vallee* є ефективним та специфічним, а до того ж запобігає розповсюдженню живих мікобактерій у природі.

За результатами контролю, виготовлені Херсонським державним підприємством – біологічна фабрика експериментальні Серія № 1 (Е) та Серія № 2 (Е) ППД-туберкуліну очищеного для ссавців відповідають вимогам ДСТУ 4664:2006: «Туберкулін очищений для ссавців у стандартному розчині» та придатні до проведення державних випробувань. Розроблене реєстраційне «Досьє» на препарат передано для узгодження в ДНКІБШМ.

**Ключові слова:** туберкульоз, мікобактерії, ППД-туберкулін,

мікрофільтрація, ультрацентрифугування.