

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ
ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-КОНТРОЛЬНИЙ ІНСТИТУТ
БІОТЕХНОЛОГІЇ І ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ

КАССІЧ ОЛЕКСІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 619:616:98:579.873.21:631.153.7

**РОЗРОБКА ПРЕПАРАТУ «ППД-ТУБЕРКУЛІН ДЛЯ ССАВЦІВ
ОЧИЩЕНИЙ» З ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДІВ МІКРОФІЛЬТРАЦІЇ
ТА УЛЬТРАЦЕНТРИФУГУВАННЯ**

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби
та імунологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата ветеринарних наук

Суми – 2018

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Харківській державній зооветеринарній академії МОН України

Науковий керівник доктор ветеринарних наук, професор
академік НААН України,
Заслужений діяч науки і техніки України,
Головко Валерій Олексійович
завідувач кафедри епізоотології та ветеринарного
менеджменту Харківської зооветеринарної академії

Офіційні опоненти доктор ветеринарних наук, професор
Корнієнко Леонід Євгенович
лауреат премії Української академії аграрних наук
«За видатні досягнення в аграрній науці»,
завідувач кафедри епізоотології та інфекційних хвороб
Білоцерківського національного аграрного університету

доктор ветеринарних наук, професор
Ткаченко Олексій Андрійович
завідувач кафедри епізоотології та інфекційних хвороб
Дніпровського державного аграрно-економічного
університету

Захист відбудеться « 19 » вересня 2018 року об 11.⁰⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 55.859.04 в Сумському національному аграрному університеті та Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів за адресою: 40021, м. Суми, вул. Г. Кондратьєва, 160, зал засідань Вченої ради (головний корпус).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеках Сумського національного аграрного університету за адресою: 40021, м. Суми, вул. Г. Кондратьєва, 160 та Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів за адресою: 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30.

Автореферат розісланий « 15 » серпня 2018 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради

Г. І. Ребенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Серед зоонозних захворювань туберкульоз за своїм соціальним, економічним, епізоотологічним та епідеміологічним значенням займає особливе місце. Туберкульоз тварин завдає значних економічних збитків сільському господарству та становить суттєву загрозу здоров'ю людей. Міжнародний ветеринарний кодекс МЕБ визначає туберкульоз як захворювання, що вимагає обов'язкового декларування. Боротьба з цією хворобою має не тільки економічне, але й соціально-гігієнічне та епідеміологічне значення (Кассіч Ю. Я., 1990, 2003; Смолянинов Ю. І., 2005; Бусол В. О., 2006, 2008; Овдієнко М. П., 2008; Гулюкин М. І., 2009; Нуратинов Р. А., 1998, 2009; Мандигра М. С., 2013; Завгородній А. І., 2015; Ткаченко О. А., 2012, 2016; Найманов А. Х., 2017 та інші).

Документи МЕБ та ЄС як основний метод виявлення заражених туберкульозом тварин передбачають тест на наявність гіперчутливості сповільненого типу (ГЧСТ) – 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 (Кассіч Ю. Я., Завгородній А. І., Тихонов П. М., Кассіч В. Ю., Доценко В. В., 2001, 2003; Дегтярьов І. М. зі співав., 2006, 2009; Білушко В. В. зі співав., 2011, 2015, 2016), який виготовляють із використанням виробничого штаму *M. bovis* ІЕКВМ-1.

Під час 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 *Mycobacterium bovis* «AN5» або «Vallee» (Колос Ю. О. зі співав., 2006; Притиченко А. Н., 2013, 2014, 2015; Головка В. О. зі співав., 2015, 2016). Тому нині актуальним напрямом досліджень є гармонізація вітчизняних ППД-туберкулінів у відповідності до вимог ЄС.

Відомо, що 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, призводить до значних втрат туберкулопротеїну, що знижує вихід кінцевого продукту. Впровадження мембранних методів в технологію виготовлення ветеринарних препаратів дозволяє підвищити екологічну безпеку виробництва за рахунок виключення з технології азбестових фільтрів, знизити використання води та втрати протеїну (Шевирев Н. С. зі співав., 1999, 2006; Корнієнко Л. Є., 2006; Безгин В. М. зі співав., 1999, 2006, 2012; Безгина Н. В. зі співав., 2006, 2007; Козлов В. Е. зі співав., 2004, 2007, 2012 та ін.).

Згідно із законодавством України, усі закупівлі в державі здійснюються на тендерній (конкурсній) основі за принципами добросовісної конкуренції серед учасників. Тому розробка та впровадження у виробництво ППД-туберкуліну для ссавців, крім Сумського, ще й на Херсонському державному підприємстві – біологічна фабрика, сприяє впровадженню державної політики тендерних закупівель.

Наведені 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.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась згідно із завданнями державних тематик науково-дослідних робіт Харківської державної зооветеринарної академії: «Сучасні методи діагностики, профілактики і заходи боротьби з інфекційними хворобами тварин та птиці» (номер державної реєстрації 0116U002777, 2016 – 2020 рр.), Сумського національного аграрного університету «Епізоотологічний моніторинг та вдосконалення засобів діагностики туберкульозу тварин» (номер державної реєстрації 0110U007591, 2010 – 2014 рр.) та «Створення інноваційних засобів моніторингу, діагностики, прогнозування та профілактики емерджентних та економічно значущих захворювань у скотарстві, свинарстві, птахівництві, рибництві, звірівництві та бджільництві на основі клітинних, молекулярних та нанотехнологій» (номер державної реєстрації 0115U001053, 2015 – 2019 рр.).

Мета і задачі дослідження. Метою роботи був відбір та впровадження у виробництво високопротеїногенних виробничих штамів *Mycobacterium bovis Vallee*, розробка ефективних і високопродуктивних живильних середовищ для їх культивування, оптимізація технології виготовлення і контролю, гармонізація ППД-туберкуліну для ссавців очищеного відповідно до вимог ЄС.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- одержати, дослідити властивості, провести депонування виробничого штаму *M. bovis Vallee* в депозитарії ДНКІБШМ та впровадити його у виробництво для виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців;
- розробити ефективні і високопродуктивні живильні середовища для культивування виробничого штаму *M. bovis Vallee*;
- розробити, оптимізувати та впровадити у виробництво технологічні прийоми виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців очищеного з використанням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування;
- розробити, оптимізувати та впровадити у виробництво методи контролю активності ППД-туберкуліну для ссавців очищеного з використанням авірулентних *M. bovis*.

- з використанням розроблених та впроваджених технологічних методів та виробничих штамів виготовити дослідно-виробничу серію препарату, провести контрольні дослідження і визначити рівень її активності.

Об'єкт дослідження: розробка технології виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців очищеного.

Предмет дослідження: виробничі штами, живильні середовища, біотехнологічні прийоми виготовлення і контролю туберкуліну.

Методи дослідження: бактеріологічні (мікроскопічні, культуральні, біологічні), імунологічні, електронномікроскопічні, молекулярно-генетичні, хімічні (визначення масової частки хлориду натрію, гліцерину, фенолу), біохімічні (визначення масової частки протеїну за методом К'ельдаля), статистичні, біотехнологічні методи: культивування, інактивації, виділення протеїнів та їх очищення шляхом діалізу, мікрофільтрації та ультрацентрифугування.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше в Україні були розроблені, задепоновані та використані для виготовлення дослідно-виробничих серій ППД-туберкуліну для ссавців очищеного виробничі штами *Mycobacterium bovis Vallee* КМІЕВ-9 та *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ (Патент на корисну модель «Виробничий штам *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ для виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців» за № 109231; Свідоцтво про первісне депонування штаму мікроорганізмів *M. bovis Valle* КМІЕВ-9 в Депозитарії ДНКІБШМ за № 538 від 03.03.2011; Свідоцтво про первісне депонування штаму мікроорганізмів *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ в Депозитарії ДНКІБШМ за № 539 від 03.03.2011).

Для адаптації, селекції та накопичення бактеріальної маси виробничих штамів розроблені та використані живильні середовища: «Синтетичне живильне середовище (Сотона КФ) для прискореного накопичення бактеріальної маси мікобактерій» (Патент на корисну модель 63246 U, МПК С12N 1/20, С 12R 1/32) та «Синтетичне живильне середовище Сотона ХБ для прискореного росту мікобактерій при виготовленні туберкуліну» (Патент на корисну модель за № 111052).

Під час виготовлення дослідно-виробничих серій ППД-туберкуліну для ссавців очищеного розроблені нові технологічні прийоми: «Спосіб отримання туберкуліну з культуральної рідини та бактеріальної маси мікобактерій» (Патент на корисну модель за № 114777 та «Спосіб виготовлення ППД-туберкуліну з використанням методів мікрофільтрації та ультрацентрифугування» (Патент на корисну модель за № 120698). Під час проведення контрольних досліджень дослідно-виробничих серій ППД-туберкуліну для ссавців очищеного розроблено «Спосіб визначення активності очищеного (ППД) туберкуліну для ссавців на тваринах, сенсibiliзованих авірулентними культурами *M. bovis*» (Патент на корисну модель за № 108460).

Практичне значення одержаних результатів. На підставі проведених досліджень на Херсонському державному підприємстві – біологічна фабрика впроваджено у виробництво під час виготовлення дослідно-виробничих серій «ППД-туберкуліну для ссавців очищеного» виробничі штами *M. bovis Vallee* КМІЕВ 9 та *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ (свідоцтва про депонування за № № 538 та 539). Для виготовлення алергену розроблені та впроваджені нові

технологічні прийоми з використанням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування. Розроблено технологічний регламент (інструкція з виготовлення) на препарат «ППД-туберкулін для ссавців очищений». Матеріали дисертаційної роботи використовуються під час викладання дисциплін інфекційного профілю на факультетах ветеринарної медицини СНАУ, ОДАУ, ДДАЕУ та ЛНУВМ та БТ.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно здійснено патентний пошук, проведено підбір літератури та написання огляду літератури. Завдяки консультаціям наукового керівника автором дисертації було визначено мету і завдання роботи, розроблено програму досліджень, відпрацьовано науково-методичні підходи щодо постановки експериментів. Дисертант з науковцями кафедри епізоотології та ветеринарного менеджменту ХДЗВА, кафедри епізоотології і паразитології СНАУ та співробітниками Державного підприємства – Херсонська біологічна фабрика (Кошельник В. Г., Колеснікова К. Ю., Терпецька Т. І.), яким автор висловлює глибоку подяку, виконав усі експериментальні дослідження. Молекулярно-генетичні та біохімічні дослідження виробничого штаму *M. bovis* Vallee KMIEB-9 виконані на базі РУП «ІЕВ» ім. С. Н. Вишелеського (м. Мінськ) його співробітниками під керівництвом професора П. А. Красочко, яким дисертант висловлює глибоку подяку. За консультативної допомоги наукового керівника дисертант проаналізував одержані результати, здійснив їх статистичну обробку та узагальнив одержані дані у висновках і пропозиціях.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на: щорічних засіданнях Вченої ради Харківської державної зооветеринарної академії у 2015–2017 роках та ФВМ Сумського національного аграрного університету у 2015-2017 рр.; щорічних науково-практичних конференціях молодих учених Сумського НАУ (2015, 2016, 2017 рр.), Ювілейній конференції, присвяченій 170-річчю ХДЗВА (2016); Науково-практичній і навчально-методичній конференції до 170-річчя з дня народження реформатора вищої ветеринарної освіти в Україні професора А. О. Раєвського «Актуальні проблеми, новітні здобутки та перспективи розвитку сучасної епізоотології», 24-25 травня 2018 р.

Публікації. Основні положення дисертації опубліковано у 13 наукових статтях, серед яких: 10 статей у наукових фахових виданнях України, що входять до затвердженого МОН України переліку; 2 – опубліковані в наукових виданнях інших держав; у 6 патентах України на корисну модель та 1 – матеріали конференції.

Структура і обсяг дисертації. Основний зміст дисертації викладено на 125 сторінках комп'ютерного тексту. Роботу ілюстровано 13 таблицями, 7 рисунками та 2 схемами і формулами. Дисертація складається з розділів: вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати власних досліджень, узагальнення результатів досліджень та їх аналіз, висновки, пропозиції виробництву, списку використаних літературних джерел, який включає 380 найменувань, у тому числі 113 – латиницею, та 13 додатків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційна робота виконана у Харківській державній зооветеринарній академії та на Херсонському державному підприємстві – біологічна фабрика в період з 2011 по 2017 роки за наведеною в табл. 1 схемою.

Загалом, під час виконання роботи використовували електронномікроскопічні, бактеріологічні (мікроскопічні, культуральні, біологічні), радіологічні, імунологічні, молекулярно-генетичні, хімічні (визначення масової частки хлориду натрію, фенолу, гліцерину), біохімічні (визначення масової частки протеїну за методом К'ельдаля), статистичні, біотехнологічні методи: культивування мікобактерій, їх інактивація, виділення протеїнів, очищення шляхом діалізу, методи мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування.

Таблиця 1.

Етапи виконання експериментальних робіт

Етапи досліджень	Виконана робота
Перший етап	Адаптація, селекція, дослідження морфологічних, культуральних та біологічних властивостей та депонування виробничих штамів <i>M. bovis Vallee</i> KMIEB-9 та <i>M. bovis Vallee</i> KMIEB-9KM
Другий етап	Розробка середовищ Сотона КФ та Сотона ХБ для виробничого культивування штамів <i>M. bovis Vallee</i> KMIEB-9 та <i>M. bovis Vallee</i> KMIEB-9KM з метою одержання ППД-туберкуліну для ссавців
Третій етап	Розробка технології виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців очищеного з використанням виробничого штаму <i>M. bovis Vallee</i> KMIEB-9KM, методів мембранної мікрофільтрації і ультрацентрифугування та впровадження їх у виробництво
Четвертий етап	Розробка способу визначення активності очищеного (ППД) туберкуліну для ссавців на тваринах, сенсibiliзованих авірулентними культурами <i>M. bovis</i>
П'ятий етап	Виготовлення дослідно-виробничої серії препарату з використанням розроблених та впроваджених технологічних методів та виробничих штамів. Проведення контрольних досліджень та визначення рівня активності експериментальної серії препарату

Культуральні та біологічні властивості виробничих штамів вивчали шляхом висіву їх на живильні середовища і зараження лабораторних тварин та великої рогатої худоби у відповідності з вимогами інструкції щодо лабораторної діагностики туберкульозу тварин та ДСТУ 4664:2006: Туберкулін очищений для

ссавців у стандартному розчині.

Під час радіологічних досліджень культуру штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 піддавали гамма-опроміненню стимулювальною дозою γ -випромінювання 0,0387 Кл/кг (150 Р) та летальними дозами 154,8–206,4 Кл/кг (600 тис.-800 тис. Р) на γ -випромінювачах РОКУС (джерело випромінювання ^{60}Co , $P=0,0138$ Гр/сек) та «Исследователь» (джерело випромінювання ^{60}Co , $P=2$ Гр/сек., 2 Гр/год., 4 Гр/хв.). Опромінення проводили на базі Інституту медичної радіології (м. Харків) під керівництвом інженера КВП О. І. Курова, якому автор висловлює глибоку подяку.

Електронномікроскопічне дослідження культури *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ виконували на приладі «РЕМ – 106 И» (ВАТ *Selmy*, 2007) спільно з кандидатом ветеринарних наук А. Г. Левченко. Препарати з мікобактерій штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ, попередньо інактивованого автоклавуванням за 110 °С упродовж 30 хв., або γ -опроміненням дозами 154,8–206,4 Кл/кг (600 тис.–800 тис. Р), готували за модифікованою методикою, що включала відбір клітинного матеріалу, фіксацію мікроорганізмів, відмивку від фіксатора та хімічне зневоднення.

Дослідження в ПЛР, визначення гідролітичної активності, нітроредуктазної реакції, перехресний імуноелектрофорез з референс-сироваткою *Mycobacterium bovis* № 8 штаму *Mycobacterium bovis Vallee* КМІЕВ-9 проведені на базі РУП «ІЕВ» ім. С. Н. Вишелеського (м. Мінськ) співробітниками установи під керівництвом професора П. А. Красочко, яким дисертант висловлює глибоку подяку.

Виготовлення туберкуліну. Як основний та контрольний використовували класичний технологічний спосіб одержання туберкуліну з культурального фільтрату мікобактерій збудника туберкульозу, вирощених на рідкому синтетичному живильному середовищі шляхом стерилізації культур, відокремлення бактеріальної маси, одержання й стерилізації культуральних фільтратів, осадження протеїну розчином трихлороцтової кислоти, переосадження його насиченим розчином сірчаноокислого амонію, очищення від солей за допомогою діалізу з подальшим визначенням концентрації протеїну.

Визначення активності ППД-туберкуліну для ссавців проводили з використанням сенсibiliзованих авірулентними культурами *M. bovis* тварин, яким вводили розведення дослідної та контрольної серій туберкуліну.

Активність туберкуліну (А) в міжнародних одиницях (МО) обчислювали за формулою:

$$A = \frac{d_1}{d_2} \times 50000 ,$$

де d_1 – сума середніх діаметрів папул на випробовувану серію, мм;

d_2 – сума середніх діаметрів папул на контрольну серію туберкуліну, мм;

50000 – кількість МО у 1 см³ основного розчину контрольної серії туберкуліну.

Контроль отриманого алергену проводили згідно з ДСТУ 4664:2006: Туберкулін очищений для ссавців у стандартному розчині.

Статистичні методи досліджень. Отримані результати обробляли методами варіаційної статистики з використанням програми «Microsoft Excel – 15,0» із обчисленням середнього арифметичного (M), стандартної похибки (m) та рівня вірогідності (p) за таблицею Ст'юдента. Різницю між двома величинами вважали

вірогідною за $p \leq 0,05$; $\leq 0,01$ і $\leq 0,001$, відповідно.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

Отримання та впровадження у виробництво ППД-туберкуліну для ссавців виробничих штамів *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 та *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ. 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. як виробничі під час виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців.

Одержаний нами в рамках творчого обміну з РУП «ІЕВ» ім.С. Н.Вишелеського (м. Мінськ) сублімований штам збудника туберкульозу бичачого виду, який згідно з паспортом штаму має назву «*M. bovis Vallee* КМІЕВ-9» розконсервували та адаптували до живильних середовищ Павловського, Левенштейна-Ієнсена, ІЕКВМ, Сотона КФ та Сотона ХБ.

З метою отримання виробничого штаму з прискореним ростом та підвищеним накопиченням бактеріальної маси мікобактерії штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ – 9 піддавали впливу гамма-опромінення. Після опромінення дозами від 0,00645 до 206,4 Кл/кг на γ -випромінювачі РОКУС (джерело випромінювання ^{60}Co , $P=0,0138$ Гр/сек) культури штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 висівали на елективні живильні середовища. В цьому випадку прискорення швидкості росту культур було статистично недостовірним. Змін ультраструктури мікроорганізмів під час електронно-мікроскопічних досліджень не спостерігали. Проте, під час культивування штаму збудника туберкульозу бичачого виду *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 на «Живильному середовищі Сотона КФ для прискореного накопичення бактеріальної маси» (Патент на корисну модель за № 63246 U) 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 $(6,0 \pm 0,3)$ доби раніше. Вихід бактеріальної маси був на $(7,4 \pm 0,3)$ мг більшим. Тобто середовище Сотона КФ мало стимулювальний ріст мікобактерій, а також селективні властивості, що призвело до отримання штаму з прискореним ростом мікобактерій. Відібраному 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». Після пересіву на виробниче середовище Сотона ХБ феномен прискорення росту зберігається впродовж 2-3 генерацій та надалі втрачається. Таким чином, 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.

Під час дослідження електронно-мікроскопічних 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. Відзначається поліморфізм мікроорганізмів (рис. 1).

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 паличок червоного кольору. На МПА та МПБ не ростуть; ростуть на яєчних та картопляних живильних середовищах тільки за 37 °С. 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.

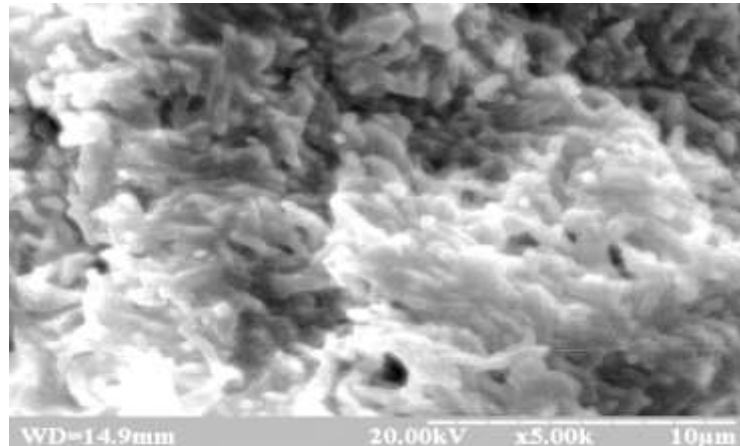


Рис. 1. Мікобактерії виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ з середовища Павловського (конгломерат паличкоподібних форм). Мікрофото на приладі «РЕМ-106 И».

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. Досліди проводили в трьох повторностях. Визначали терміни початку первинного, суцільного росту та вагу накопиченої бактеріальної маси виробничих штамів. Результати дослідів наведені в таблиці 2.

Дані таблиці 2 свідчать, що культура *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ починала рости раніше на 2,0 доби, давала більше на 6,0 мг накопичення бактеріальної маси. Мікробна плівка формувалась на 4,5 доби раніше, порівняно з вихідним штамом *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9.

Таким чином, використання виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ дозволяє прискорити ріст і підвищити накопичення бактеріальної маси мікобактерій з одного флакона від $(59,5 \pm 3,5)$ 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 виробничих штамів у Депозитарії ДНКІБІШМ. 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.

Таблиця 2

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

Дослід 1	Дослід 2	Різниця, p
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	2,0 $p < 0,05$
Термін формування мікробної плівки (через, діб)		
19,5±3,0	15,0±0,9	4,5 $p < 0,05$
Вага накопиченої бактеріальної маси (мг)		
59,5±0,3	65,5±0,2	6,0 $p < 0,05$

Розробка живильних середовищ для промислового культивування мікобактерій виробничих штамів. Під час виконання підготовчих робіт в 2010-2011 рр. нами було розроблене «Синтетичне живильне середовище Сотона КФ для прискореного накопичення бактеріальної маси мікобактерій» (Патент України на корисну модель за № 63246 від 10.10.2011 р.). Поставлене завдання вирішували шляхом заміни у складі середовища Сотона за класичним медичним прописом заліза лимоннокислого аміачного двовалентного (зеленого) на залізо сірчаноокисле ($FeSO_4$) та додавання амонію лимоннокислого двозаміщеного ($C_6H_{14}O_7N_2$), цинку сірчаноокислого ($ZnSO_4$) і вітамінів B_1 та B_{12} . На середовищі Сотона КФ, порівняно з середовищем Сотона, за класичним прописом появу первинного росту культури виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 спостерігали на (3,0±0,2) доби раніше; формування суцільного росту (мікробної плівки) – на 6,0 доби раніше. Вихід бактеріальної маси був на (7,0±0,3) мг більшим ($p < 0,05$).

У подальшому була проведена робота з розробки середовища для виробничого культивування штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ під час виготовлення туберкуліну в умовах Херсонського державного підприємства – біологічна фабрика. В цьому випадку за основу взяли середовище Сотона, що пропонує індійська компанія *HIMEDIA*, доступне за складом компонентів та вартістю. 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 (на базі середовища Сотона *HIMEDIA* з додаванням вітамінів B_1 та B_{12}) забезпечило прискорення росту культур збудника туберкульозу на (2,0±1,0) доби і накопичення бактерійної маси мікобактерій на (5,8±1,9) мг ($p < 0,05$), що підвищує вихід кінцевого продукту (туберкуліну) з одиниці об'єму середовища.

Оптимізація технологічних методів виготовлення ППД-туберкуліну.

Черговим етапом роботи була розробка технології виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців очищеного з використанням методів мембранної мікрофільтрації, ультрацентрифугування та впровадження їх у виробництво, тобто виготовлення у виробничих умовах дослідно-виробничих серій препарату.

Основою для виготовлення очищених (ППД) туберкулінів для ссавців та птиці і алергенів із атипичних мікобактерій (КАМ, ААМ) є протеїни мікобактерій, які містяться у фільтратах культур. Принцип отримання очищеного деривату туберкулопротеїну (*Purified Protein Derivatv – 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 удосконалений *М. А. Лінніковою* (1959), *О. М. Говоровим*, *Ф. І. Осташком* (1952, 1956), *Ю. Я. Кассічем*, *В. В. Білушком*, *А. І. Завгороднім* (2004, 2006, 20011, 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 стерилізувальна фільтрація через азбестові фільтри, що не дозволяє одержати гарантовано стерильний препарат та призводить до втрат на таких фільтрах значної кількості білка.

Для уникнення зазначених недоліків нами розроблена 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 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, що необхідно для економічності компоновки системи, під час утримуючої мікробної фільтрації забезпечують найвищі показники загальної пропускної здатності і найвищий вихід протеїну. Після мікрофільтрації на ультрафільтраційних мембранних фільтрах *Sartoclean® CA* з діаметром пор 0,2-0,45 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.

Результати дослідів наведені в таблиці 3. Дані таблиці свідчать, що під час використання для виготовлення туберкуліну технології з мембранною мікрофільтрацією та ультрацентрифугуванням у препараті достовірно (на 8,6 г) збільшується вихід туберкулопротеїну після осадження трихлороцтовою кислотою, вихід туберкулопротеїну з 1 л середовища (на 0,7 г) та масова частка білка (на 0,6 мг/см³).

Таблиця 3

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

Характеристика досліджу	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
Різниця, <i>p</i>	8,6 <i>p</i> < 0,05	0,7 <i>p</i> < 0,05	0,6 <i>p</i> < 0,05

За рахунок використання ультрафільтраційних мембран з пропускну здатністю 150-1000 кДа та капсул Sartoclean® SA з діаметром пор 0,2-0,45 мкм препарат виходить стерильним, високоочищеним, містить білкові фракції з найвищими показниками діагностичної активності і специфічності (150-1000 кДа).

Розробка способу контролю активності ППД-туберкуліну для ссавців очищеного з використанням авірулентних *M. bovis* та контроль якості експериментальних серій.

Під час виготовлення алергену для діагностики туберкульозу ссавців на Державному підприємстві – Сумська біологічна фабрика використовують «Спосіб контролю визначення активності туберкуліну очищеного ППД для ссавців» (Кассіч Ю.Я. зі співав., 1999), що передбачає використання для сенсibilізації тварин як патогенного збудника туберкульозу бичачого виду, так і атенуйованого вакцинного штаму *M. bovis* БЦЖ. Проте, живі культури *M. bovis* є потенційно небезпечними в епідеміологічному та епізоотологічному відношенні, оскільки існує можливість реверсії, тобто відтворення патогенності атенуйованого штаму.

Запропонована нами технологічна схема одержання та контролю ППД-туберкуліну для ссавців очищеного наведена на рис. 2

В основу нашої роботи була поставлене завдання розробити специфічний та безпечний для здоров'я тварин і людей спосіб визначення активності ППД-туберкуліну для ссавців у дослідках на мурчаках та великій рогатій худобі з використанням інактивованої автоклавуванням бактеріальної маси *M. bovis* штаму *Vallee*. В якості контролю використовували сенсibilізованих культурою вакцинного штаму БЦЖ тварин. Сенсibilізацію великої рогатої худоби і морських свинок, визначення активності випробуваної серії порівняно з контрольною, визначення відсутності мікробної контамінації, інші методи контролю препарату проводили відповідно до вимог ДСТУ 4664:2006: «Туберкулін очищений для ссавців у

стандартному розчині». Дослідно-виробничі серії № 1 (Е) та № 2 (Е), ППД-туберкуліну для ссавців очищеного були виготовлені в 2015 та 2016 роках із використанням розроблених та впроваджених технологічних методів і виробничих штамів.



Рис. 2. Технологічна схема одержання ППД-туберкуліну для ссавців очищеного. Позначкою «*» помічені модифіковані технологічні операції.

На підставі проведених експериментів 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, виготовлені Херсонським державним підприємством – біологічна фабрика є активними, специфічними та придатними для алергічного дослідження на туберкульоз. Активність серій туберкуліну № 1 (Е) та № 2 (Е) в міжнародних одиницях (МО) становила 49000 МО/см³ та 47000 МО/см³, відповідно (за ДСТУ 4664:2006 : 50000 ± 15000 МО/см³).

Встановлено, що способи визначення активності туберкуліну на сенсibiliзованій інактивованою культурою *M. bovis Vallee* великій рогатій худобі і мурчаках та на щеплених вакцинним штамом БЦЖ тваринах є однаково ефективними. Спосіб контролю активності туберкуліну на тваринах, щеплених інактивованою бактеріальною масою *M. bovis Vallee*, є ефективним та специфічним, а також 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 для ссавців очищеного відповідають вимогам ДСТУ 4664:2006: «Туберкулін очищений для ссавців у стандартному розчині».

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі викладено теоретичне та експериментальне обґрунтування, узагальнені результати дослідження щодо розробки, впровадження та гармонізації відповідно до вимог ЄС препарату «ППД-туберкулін для ссавців очищений» для алергічної діагностики туберкульозу тварин. Експериментальним шляхом відібрані та впроваджені виробничі штами і технологічні прийоми виготовлення та контролю препарату. За результатами експериментальних досліджень, порівняно з контрольними серіями, доведено високу протеїногенність виробничих штамів та діагностичну активність і специфічність дослідно-виробничих серій алергену.

1. Відібрані шляхом селекції, задепоновані та впроваджені у виробництво виробничі штами *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 та *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ є високопротеїногенними, відповідають вимогам Директиви Ради ЄС 97/12 (від 17 березня 1997 р.) та використані під час виготовлення 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±0,1) мг/см³, а в пробі туберкуліну з штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ є достовірно більшою ($p<0,05$) і становить (1,20±0,2) мг/см³.

2. 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 флакона на 6,0 мг і дає можливість відповідно прискорити технологічний процес та збільшити вихід туберкуліну до (1,2±0,1) мг/см³.

3. Для адаптації, селекції та накопичення бактерійної маси виробничих штамів розроблені живильні середовища «Синтетичне живильне середовище Сотона КФ для прискореного накопичення бактеріальної маси мікобактерій» та «Синтетичне живильне середовище Сотона ХБ для прискореного росту мікобактерій», які забезпечують інтенсивний ріст та накопичення бактеріальної маси *M. bovis*.

На середовищі Сотона КФ, порівняно з середовищем Сотона за класичним прописом, появу первинного росту культури виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 спостерігали на 3,0 доби раніше; суцільного росту (мікробної плівки) – на 6,0 доби раніше. Вихід бактеріальної маси на $(7,0 \pm 0,3)$ мг більший.

Культивування *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ на середовищі Сотона ХБ забезпечило прискорення росту культур збудника туберкульозу 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.

4. Розроблені нові технологічні прийоми виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців очищеного з використанням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування дозволили отримати високоактивний та специфічний діагностичний алерген. В препараті достовірно збільшуються ($p < 0,05$) вихід протеїну після осадження ТХО (на 8,6 г), вихід туберкуліну з 1 л середовища (на 0,7 г) та масова частка білка (на $0,6 \text{ мг/см}^3$). Preparat виходить стерильним та високоочищеним.

5. Після мікрофільтрації на ультрафільтраційних мембранних фільтрах Sartoclean® CA з діаметром пор $0,2\text{--}0,45 \text{ мкм}$ та НОММ 150-1000 кДа препарат містить білкові фракції мікобактерій з молекулярною масою 150-1000 кДа, які мають найвищі показники діагностичної активності та специфічності.

6. Розроблений спосіб визначення активності очищеного (ППД) туберкуліну для ссавців на тваринах, сенсibilізованих авірулентними культурами *M. bovis*, що передбачає використання інактивованих мікобактерій, є активним та специфічним. Визначення активності туберкуліну на сенсibilізованій інактивованою культурою *M. bovis Vallee* великій рогатій худобі і мурчаках та на щеплених вакцинним штамом БЦЖ тваринах є однаково ефективним. Дослідно-виробничі Серія № 1 (Е) та Серія № 2 (Е) ППД-туберкуліну для ссавців очищеного виявили високу діагностичну активність (49000 МО/см^3 та 47000 МО/см^3 відповідно) і відповідають вимогам ДСТУ 4664:2006: «Туберкулін очищений для ссавців у стандартному розчині».

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Науково-практичне значення результатів досліджень полягає у впровадженні в практику ветеринарної медицини науково обґрунтованих технологій та високопротейногенних виробничих штамів, що відповідають вимогам Директиви Ради ЄС 97/12 (від 17 березня 1997 р.) та стандарту ЄС, що надає *Institute voor Dierhouderijen Diergenzondheid (ID-DLO), Lelistad, The Netherlands* і забезпечують виготовлення високоактивного та специфічного діагностичного алергену ППД-туберкуліну для ссавців очищеного.

З метою підвищення якості алергічної діагностики на підставі проведених досліджень на Херсонському державному підприємстві – біологічна фабрика впроваджено у виробництво під час виготовлення дослідно-виробничих серій ППД-туберкуліну для ссавців очищеного виробничі штами *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 та *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ (Свідоцтва про депонування за № № 538 та 539). Розроблені та впроваджені у виробництво нові живильні середовища і технологічні прийоми виготовлення алергену та технологічний регламент на препарат «ППД-туберкулін для ссавців очищений».

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Головка, В. О., **Кассіч, О. В.**, Кассіч, В. Ю. та Левченко, А. Г. (2016). Збудники туберкульозу і атипові мікобактерії, їх ультраструктура, диференціація та епізоотологічне значення. *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. Зб. наук. праць.* 33, 2, 95–101. (Дисертант підібрав та проаналізував літературу, за його участю виконана експериментальна робота, прийняв участь в оформленні матеріалів).

2. Кассіч, В. Ю., Фотіна, Т. І., Камбур, М. Д. та **Кассіч, О. В.** (2010). Радіаційна стерилізація мікобактерій. *Вісник Сумського НАУ*, 8 (27), 44–49. (Дисертант приймав участь у виконанні експериментальної частини роботи та в оформленні матеріалів).

3. Кассіч, В. Ю., Фотіна, Т. І., Березовський, А. В., Фотіна, Г. А., **Кассіч, О. В.**, Полоз, І. П. та Власенко, О. А. (2010). Дезінфекція виробничих приміщень неблагополучних щодо туберкульозу господарств з використанням препарату «Бровадез-плюс». *Вісник Сумського НАУ*, 8 (27), 44–49. (Дисертант приймав участь у виконанні експериментальної частини роботи та в оформленні матеріалів).

Статті у наукових фахових виданнях України, включених до науково-метричних баз:

1. Головка, В. О., **Кассіч, О. В.**, Кассіч, В. Ю., Колеснікова, К. Ю. та Кошельник, В. Г. (2015). Вивчення властивостей виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ – 9 КМ. *Вісник Сумського НАУ*, 1 (36), 106–109. (Дисертант приймав участь у виконанні експериментальної частини роботи, в аналізі, узагальненні та оформленні матеріалів).

2. Головка, В. О., **Кассіч, О. В.**, Кассіч, В. Ю., Колеснікова, К. Ю. та Кошельник, В. Г. (2015). Продукція туберкулопротеїнів виробничим штамом *M. bovis Vallee* КМІЕВ–9 КМ. *Вісник Сумського НАУ*, 7 (37), 104–108. (Дисертант приймав участь у виконанні експериментальної частини роботи та оформленні матеріалів).

3. Головка, В. О., **Кассіч, О. В.** та Кассіч, В. Ю. (2016). Сучасні проблеми інфекційної патології в Україні. *Вісник Сумського НАУ*, 6 (38), 119–124. (Дисертантом підбрано та проаналізовано літературу, виконано експериментальну частину роботи, прийнято участь в оформленні матеріалів).

4. Кассіч, В. Ю., Левченко, А. Г., Івченко, В. Д., **Кассіч, О. В.** та Головка, В. О.

(2016). Алергічна діагностика зоонозів та засоби для її проведення. *Вісник Сумського НАУ*, 1 (40), 164–169. (Дисертант виконав експериментальну частину роботи, прийняв участь в оформленні матеріалів).

5. Кассіч, В. Ю., Левченко, А. Г., **Кассіч, О. В.**, Головка, В. О. та Терпецька, Т.О. (2016). Контроль якості експериментальної серії ППД-туберкуліну для ссавців *Вісник Сумського НАУ*, 11 (39), 100–106. (Дисертант приймав участь у виконанні експериментальної частини роботи та оформленні матеріалів).

6. Кассіч, В. Ю., Левченко, А. Г. та **Кассіч, О. В.** (2017). Аналіз та впровадження режимів стерилізації виробничих штамів мікобактерій. *Вісник Сумського НАУ*, 11 (41), 86–90. (Дисертант виконав експериментальну частину роботи та приймав участь в оформленні матеріалів).

7. **Кассіч, О. В.**, Левченко, А. Г. та Кассіч, В. Ю. (2017). Алергічні дослідження на туберкульоз великої рогатої худоби та мурчаків з використанням препарату «ППД-туберкулін для ссавців очищений» *Вісник Сумського НАУ*, 1 (42), 276–281. (Дисертант приймав участь у виконанні експериментальної частини роботи та оформленні матеріалів).

Статті у наукових виданнях інших держав:

1. **Кассич, А. В.**, Левченко, А. Г. и Кассич, В. Ю. (2016). Изменчивость облученных микобактерий. *Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»*, 52, 1, 38–42. (Дисертант приймав участь у виконанні експериментальної частини роботи та оформленні матеріалів).

2. **Кассич, А. В.** и Левченко, А. Г. (2017). Модифицированная методика подготовки производственного штамма *M. bovis «Vallee» КМИЭВ-9КМ* для исследований растровым электронным микроскопом. *Учреждение образования «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»*. – *Молодежь и инновации*, 2, 105–107. (Дисертант приймав участь у виконанні експериментальної частини роботи та оформленні матеріалів статті).

Статті у інших виданнях України, включених до науково-метричних баз:

1. Кассіч, В.Ю., Левченко, А.Г., Байдевятов, Ю.А., Ребенко, Г.І., Головка, В.О., **Кассіч, О. В.**, Ушкалов, В. О. та Волосянко. О. В. (2017). Дослідження впливу опромінення на ультраструктуру та мінливість мікобактерій. *Scientific Journal «ScienceRise». Ветеринарні науки*. № 11 (40), 6–14. (Дисертант приймав участь у підборі та аналізі літератури, виконанні експериментальної частини роботи та оформленні матеріалів).

Патенти:

1. Патент на корисну модель за № 109231 «Виробничий штам *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ для виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців», виданий згідно із заявкою № а201505875, пріоритет від 5.08.2016 року. Розробники: В. Ю. Кассіч, **О. В. Кассіч**, К. Ю. Колеснікова, В. Г. Кошельник. (Здобувач брав участь у розробці принципу корисної моделі, експериментальних дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).

2. Патент на корисну модель за № 63246 U, МПК С12N 1/20, С 12R 1/32 від 10.10.2011 «Синтетичне живильне середовище (Сотона КФ) для прискореного накопичення бактеріальної маси мікобактерій». Розробники: В. Ю. Кассіч,

Т. І. Фотіна, В. Г. Дзюба, Г. А. Фотіна, В. В. Доценко, **О. В. Кассіч**, І. П. Полоз. *(Здобувач брав участь у розробці принципу корисної моделі, експериментальних дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

3. Патент на корисну модель за № 111052 від 25.10.2016 року «Синтетичне живильне середовище Сотона ХБ для прискореного росту мікобактерій при виготовленні туберкуліну», виданий згідно із заявкою № u201605232. Розробники: В. Ю. Кассіч, **О. В. Кассіч**, К. Ю. Колеснікова, В. Г. Кошельник, Т. О. Терпецька. *(Здобувач брав участь у розробці принципу корисної моделі, експериментальних дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

4. Патент на корисну модель за № 108460 від 25.07.2016 «Спосіб визначення активності очищеного (ППД) туберкуліну для ссавців на тваринах, сенсibiliзованих авірулентними культурами *M. bovis*», виданий згідно із заявкою № a201509959. Розробники: В. Ю. Кассіч, **О. В. Кассіч**, К. Ю. Колеснікова, В. Г. Кошельник, Т. О. Терпецька. *(Здобувач брав участь у розробці принципу корисної моделі, експериментальних дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

5. Патент на корисну модель за № 114777 від 27.03.2017 року «Спосіб отримання туберкуліну з культуральної рідини та бактеріальної маси мікобактерій», виданий згідно із заявкою № u201604892. Розробники: В. Ю. Кассіч, **О. В. Кассіч**, К. Ю. Колеснікова, В. Г. Кошельник, Т. О. Терпецька. *(Здобувач брав участь у розробці принципу корисної моделі, експериментальних дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

6. Патент на корисну модель за № 120698 від 10.11.2017 «Спосіб виготовлення ППД-туберкуліну з використанням методів мікрофільтрації та ультрацентрифугування», виданий згідно із заявкою u201708588. Розробники: К. Ю. Колеснікова, **О. В. Кассіч**, В. Ю. Кассіч, В. Г. Кошельник, Т. О. Терпецька. *(Здобувач брав участь у розробці принципу корисної моделі, експериментальних дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

АНОТАЦІЯ

Кассіч О. В. Розробка препарату «ППД-туберкулін для ссавців очищений» з використанням методів мікрофільтрації та ультрацентрифугування. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія. – Сумський національний аграрний університет та Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, Суми, 2018.

В дисертаційній роботі викладено теоретичне та експериментальне обґрунтування, узагальнені результати дослідження щодо розробки, впровадження та гармонізації відповідно до вимог ЄС препарату «ППД-туберкулін для ссавців очищений». Відібрані шляхом селекції, задепоновані виробничі штами *M. bovis* Vallee КМІЕВ-9 та *M. bovis* Vallee КМІЕВ-9КМ виявились високопротеїногенними, відповідають вимогам Директиви Ради ЄС 97/12 (від 17 березня 1997 р.) і використані під час виготовлення 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 достовірно більше і становить $(1,20 \pm 0,2)$ мг/см³. Виробничий штам мікобактерій *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ при культивуванні на синтетичних живильних середовищах дозволяє прискорити ріст і підвищити накопичення бактерійної маси мікобактерій з одного флакона на $(16,1 \pm 0,2)$ мг і дає можливість відповідно збільшити вихід туберкуліну до $(1,20 \pm 0,1)$ мг/см³.

Для адаптації, селекції та накопичення бактерійної маси виробничих штамів розроблені живильні середовища Сотона КФ та Сотона ХБ, на яких культура *M. bovis* починає рости раніше на $(4,2 \pm 1,1)$ доби і дає більше накопичення бактерійної маси, мікробна плівка формується на $(4,1 \pm 0,9)$ доби раніше, в порівнянні з вихідним штамом.

Розроблено нові технологічні прийоми виготовлення ППД-туберкуліну з використанням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування при 14 тис. об./хв., що дозволило отримати високоактивний та специфічний діагностичний алерген. Під час виготовлення туберкуліну з використанням розробленої технології в препараті достовірно збільшується 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 гарантовано стерильним та високоочищеним.

Для проведення контрольних досліджень дослідно-виробничих серій туберкуліну розроблено спосіб визначення активності очищеного (ППД) туберкуліну для ссавців на тваринах, сенсibilізованих авірулентними культурами *M. bovis*. Розроблений спосіб є специфічним та безпечним для здоров'я тварин та людей, запобігає розповсюдженню живих мікобактерій у природі.

Дослідно-виробничі серії ППД-туберкуліну для ссавців очищеного виявили високу діагностичну активність та специфічність. Активність випробовуваних серій туберкуліну №1 (Е) та № 2 (Е) становила 49000 МО/см³ та 47000 МО/см³ відповідно, що відповідає вимогам ДСТУ 4664:2006 та Директиви Ради ЄС 97/12 від 17 березня 1997 р., згідно з якою туберкулінізацію тварин проводять із використанням туберкулінів *PPD* або *HCSM*, які повинні виготовлятися з штамів *M. bovis* «AN5» або «Vallee».

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

ABSTRACT

Kassich O. V. Drug development of «PPD Tuberculin Mammalian purified» theoretical and practical justification. – Scientific work. Manuscript.

The thesis for the degree of PhD in veterinary sciences on a specialty 16.00.03 – veterinary microbiology, epizootology, infectious diseases and immunology. Sumy national agrarian university and State scientific and control institute of biotechnology and strains of microorganisms, Sumy, 2018.

Production strains and technological methods of manufacturing and control of the drug are experimentally selected and implemented in production.

According to the results of experimental studies, in comparison with the control series, high proteinogenicity of the production strains and the diagnostic activity and specificity of the experimental and production series of the allergen have been proved.

The thesis devoted to identify theoretical and practical justification, summarized research results of development, implementation and harmonization with the EU requirements «PPD Tuberculin Mammalian purified» drug for the allergic reactions of the macroorganism.

Selected by breeding, the sealed production strains *M. bovis* Vallee KMIEV-9 and *M. bovis* Vallee KMIEV-9KM appeared to be highly proteinogenic, they comply with the requirements of Council Directive 97/12 (dated March 17, 1997) and used during the production of experimental production series PPD-tuberculin for purified mammalian.

This strain as a product of mycobacteria with accelerated growth isolates selection was named " production strain of TB bovine pathogen *M. bovis* Vallee KMIEV-9KM ". The resulting strain is a phenotypic modifier of the TB pathogen bovine strain *M. bovis* Vallee KMIEV-9. After the strain passage to the productive synthetic medium of Soton HB, the phenomenon of the growth acceleration is kept up during 2-3 generations but it is lost later on.

The mass fraction of protein in a sample of tuberculin made from the strain *M. bovis* Vallee KMIEV-9 is $(0,89 \pm 0,1) \text{ mg / cm}^3$, while in the sample of tuberculin of the strain *M. bovis* Vallee, KMIEV-9KM it is significantly higher ($p < 0,05$) and it comes up to $(1,20 \pm 0,2) \text{ mg / cm}^3$. The production strain of mycobacterium *M. bovis* Vallee KMIEV-9KM during cultivation on a synthetic nutrient medium of Soton HB or KF allows to accelerate the growth and increase the accumulation of bacterial mass of mycobacteria from one vial to $(16,1 \pm 0,2) \text{ mg}$ and allows to increase the output of tuberculin accordingly to $(1,20 \pm 0,1) \text{ mg / cm}^3$. For the adaptation, selection and accumulation of production strains bacterial mass, Soton KF and Soton-KhB nutrient media were developed, on which the *M. bovis* culture begins to grow $(4,2 \pm 1,1)$ days earlier and gives more accumulation of bacterial mass (microbial film is formed $(4,1 \pm 0,9)$ days earlier, in comparison with an initial strain).

New technological methods of PPD-tuberculin manufacturing have been developed: the method of obtaining tuberculin from culture fluid and bacterial mass of mycobacteria, and the method of manufacturing PPD-tuberculin using membrane microfiltration and ultracentrifugation methods, which allowed to obtain highly active and specific diagnostic allergen. We have proposed a technological scheme of the PPD-tuberculin production, including the culture fluid treatment after the production strain *M. bovis* Vallee KMIEV-9KM bacterial mass separation by membrane microfiltration method, using Sartoclean® CA capsules with $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ pore diameter and by protein fractions of tuberculin separation after trichloroacetic acid deposition by ultracentrifugation followed by the resulting permeates sterilizing microfiltration through the Sartoclean® CA capsules with $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ pore diameter. The protein from the suspension was separated from the liquid by our proposed ultracentrifugation method at 14000 rpm. using an industrial low volumetric high-speed separator ("Supercentrifuge SGO-100x75" - 15 thousand rev / min; rotor speed 256 thousand / min.). Using membrane microfiltration and ultracentrifugation technologies for the tuberculins production, the yield of tuberculoprotein after

trichloroacetic acid deposition increases ($8,6 \pm 0,5$) g, from 1 liter of medium to ($0,7 \pm 0,1$) g and the proteinweight part to ($0,6 \pm 0,1$) mg / cm³. The drug was sterile and highly purified.

When making tuberculin with the use of membrane microfiltration technology and ultracentrifugation at 14000 rpm., some product characteristics significantly increases: the protein yield after trichloroacetic acid precipitation(to $8,6 \pm 0,5$ g), the yield of tuberculin from 1 liter of medium ($0,7 \pm 0,1$ g) and the mass fraction of protein (to 0.6 ± 0.1 mg / cm³). The drug is guaranteed to be sterile and highly purified. To conduct control studies of experimental and production series PPD-tuberculin for mammals, a method has been developed for determining the activity of purified tuberculin (MAP) for mammals in animals suspected of avirulent cultures of *M. bovis*, which involves the use of inactivated or attenuated mycobacteria.

The developed method is specific and safe for the health of animals and humans and prevents the proliferation of living mycobacteria in nature. Experimental research series No. 1 (E) and No. 2 (E) PPD-Tuberculin for purified mammals have showed high diagnostic activity and specificity.

The activity of the tested series of tuberculins No. 1 (E) and No. 2 (E) was 49000 IU / mg and 47000 IU / mg, respectively, which complies with DSTU 4664:2006 and Council Directive 97/12 of 17 March 1997, according to this Directive, the tuberculinization of animals is carried out using *PPD* or *HCSM* tuberculins, which have to be manufactured from *M. bovis* strains *AN5* or *Vallee*.

It has been proved that methods for determining of the activity of tuberculin on cattle and molluscs, grafted with inactivated culture of *M. bovis* and on animals, vaccinated with *BCG* strains are equally effective and can be used to control the activity of *PPD*-tuberculin for mammals. The method of tuberculin activity monitoring in animals, vaccinated with inactivated bacterial mass *M. bovis*, is effective and specific, and in addition, it prevents the proliferation of living mycobacteria in nature. According to the control results, experimental series No. 1 (E) and Series № 2 (E) PPD-tuberculin purified for mammals, produced by the Kherson State Enterprise – the biological factory, satisfy the requirements of DSTU 4664: 2006 and are suitable for state tests.

The "Dossier" developed for the drug has been submitted for coordination in the State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains (Kyiv, Ukraine).

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

АННОТАЦИЯ

Кассич А. В. Разработка препарата «ППД-туберкулин для млекопитающих очищенный» с использованием методов микрофльтрации и ультрацентрифугирования. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология, эпизоотология, инфекционные болезни и иммунология. – Сумской национальный аграрный университет. Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов. – Сумы, 2018.

В диссертационной работе приводятся теоретическое, экспериментальное обоснование и обобщенные результаты исследований по разработке препарата «ППД-туберкулин для млекопитающих очищенный». Отобранные путем селекции высокопротеиногенные производственные штаммы *M. bovis* Valle КМІЕВ-9 и *M. bovis* Valle КМІЕВ-9КМ соответствуют требованиям Директивы Совета ЕС 97/12 (от 17 марта 1997 г.) и использованы при изготовлении опытно-производственных серий ППД-туберкулина для млекопитающих.

Для адаптации, селекции и накопления бактериальной массы производственных штаммов разработаны питательные среды Сотона КФ и Сотона-ХБ, на которых культуры *M. bovis* начинают расти раньше на $(4,2 \pm 1,1)$ суток и дают большее накопление бактериальной массы.

Разработаны новые технологические приемы изготовления ППД-туберкулина с использованием методов микрофльтрации и ультрацентрифугирования, что позволило получить активный и специфический аллерген. При этом достоверно увеличился выход протеина после осаждения ТХО на $(8,6 \pm 0,5)$ г, выход туберкулина с 1 л среды на $(0,7 \pm 0,1)$ г и массовая доля белка на $(0,6 \pm 0,1)$ мг/см³; препарат выпускается гарантированно стерильным и высокоочищенным.

Для проведения контрольных исследований препарата разработан способ сенсibilизации подопытных животных инаktivированной культурой *M. bovis*. Способ является специфичным, безопасным для здоровья животных и людей, препятствует распространению живых микобактерий в природе. Активность испытуемых экспериментальных серий ППД-туберкулина №№ 1 и 2 составляет 49000 МО/см³ и 47000 МО/см³ соответственно.

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

Підп. до друку 14.08.2018 р. Формат 60х84/16. Папір офсетний.
Гарнітура Times New Roman. Друк офсетний.
Обл.-вид. арк. 0,9. Тираж 100 пр. Вид. № 1548.

Віддруковано у ВВП “Мрія-1”.
40000, м. Суми, вул. Кузнечна, 2.
Тел. 22-13-23, 22-15-05, 67-92-15.

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи:
серія ДК, №36 від 19.04.2000.