

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКА ДЕРЖАВНА ЗООВЕТЕРИНАРНА АКАДЕМІЯ**

**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**

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

КАССИЧ ОЛЕКСІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 619:616:98:579.873.21:631.153.7

ДИСЕРТАЦІЯ

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

16.00.03 – Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні
хвороби та імунологія

211 – Ветеринарна медицина

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ О. В. Кассіч

Науковий керівник: Головка Валерій Олексійович, доктор ветеринарних
наук, професор, академік НААН України, Заслужений діяч науки і техніки
України

Суми – 2018

Анотація

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук (доктора філософії) за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія (211 – Ветеринарна медицина) – Харківська державна зооветеринарна академія, 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 з вимогами ЄС препарату «ППД-туберкулін для ссавців очищений» для алергічної діагностики туберкульозу тварин. Експериментальним шляхом відібрані та впроваджені у виробництво виробничі штами і технологічні прийоми виготовлення та контролю препарату. За результатами експериментальних досліджень в порівнянні з контрольними серіями доведено високу протейногенність виробничих штамів та діагностичну активність і специфічність дослідно-виробничих серій алергену.

Робота виконана в п'ять послідовних етапів. 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 виробних при виготовленні ППД-туберкуліну для ссавців. Нині при виробництві цього препарату в Україні використовують штам *Mycobacterium bovis-IEKBM-1* (Кассіч Ю. Я.з 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 паспорту штаму має назву «*Mycobacterium bovis Vallee* КМІЕВ-9» (Додаток А) розконсервували та адаптували до щільних елективних живильних середовищ Павловського, Левенштейна-Ієнсена, 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 двоохзаміщеного ($C_6H_{14}O_7N_2$), 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 стимулюювальні 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 °С. 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. В подальшому визначали терміни початку росту, формування плівки (суцільного росту) та вагу накопиченої бактеріальної маси виробничих штамів. Для цього проводили культивування та накопичення бактеріальної маси мікобактрій 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 порівняно 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 компанії *HIMEDIA*. Модифікація цього середовища полягала в додаванні до основного складу інгредієнтів вітамінів групи В, як факторів росту. Застосування в процесі виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців

синтетичного живильного середовище 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*[®] *CA* з діаметром пор 0,45 мкм та відділення білкових фракцій туберкуліну після осадження їх трихлороцтовою кислотою шляхом ультрацентрифугування з подальшою стерилізувальною мікрофільтрацією одержаних пермеатів через капсули *Sartoclean*[®] *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 високообертовому сепараторі або ультрацентрифузі («Сверхцентрифуга СГО-100х75» – 15 тис.об.хв.; або «Сверхцентрифуга ОТР-17», швидкість обертів ротора 256 тис./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/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 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 білка 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 дослідках 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 порівняно 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».

З використанням 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. В дослідках 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/см³ та 47000 МО/см³, 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.

ABSTRACT

Kassich A. V. Drug development of «PPD Tuberculin Mammalian purified» theoretical and practical justification. – Qualifying scientific work Manuscript.

The thesis for the degree of PhD in veterinary science on a specialty 16.00.03 – veterinary microbiology, epizootology, infectious diseases and immunology (211 – Veterinary medicine). – Kharkiv State Veterinary Academy, Sumy National Agrarian University and State Scientific Control Institute of biotechnology and strains of microorganisms. – Sumy, 2018.

The thesis devoted to identify theoretical and practical justification, research results of development, implementation and harmonization with the EU requirements «PPD Tuberculin Mammalian purified» drug for allergic diagnosis of animal tuberculosis. 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 work has been executed in five successive stages. The first stage was the selection of production strains. For this purpose, adaptation, selection, and research of the biological properties of the production strain *M. bovis* Vallee were carried out. This strain, like the strain AN-5, is recommended by Council Directive EU 97/12 of

17 March 1997 as a production strain for the production of PPD Tuberculin Mammalian. At present, for the production of this drug in Ukraine, it is used the strain *M. bovis*-IEKVM-1 (Kassich Yu. Ya. in co-authorship, 1999). The scientific task was solved like this: The Institute of Experimental Veterinary Medicine named after S. N Vyshhelesky (Minsk, Belarus) has delivered us the sublimated strain of a bovine tuberculosis pathogen, called "*M. bovis Vallee* KMIEV-9, according to the "strain passport", it was re-activated and adapted to the dense elective nutrient medium of Pavlovsky, Lowenstein-Jensen, IECVM, and liquid synthetic nutrient medium of Soton KF and Soton HB. For the accelerated accumulation of mycobacteria bacterial mass, we have worked out a synthetic nutrient Soton KF medium. In the Soton KF medium, in comparison with the Soton medium by the classical version, the primary growth appearance of the production strain *M. bovis Vallee* KMIEV-9 culture was observed ($3,0 \pm 0,1$) days earlier; the formation of continuous growth (microbial film) - ($6,0 \pm 0,3$) days earlier. The bacterial mass yield was (7.4 ± 0.3) mg higher. So, the Soton KF medium has stimulated the growth of mycobacteria, as well as selective properties, and it led to the obtainment of the strain with accelerated growth of mycobacteria.

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. Thus, the acquired characters of accelerated growth are the result of phenotypic modifications, but not mutational changes at the genome level (not inherited).

During the study of electron microscopic drugs from cultures of the production strain *M. bovis Vallee* KMIEV-9KM it is noted that mycobacteria have the appearance of short or moderately long sticks, sometimes located in the form of clumps, conglomerates. It has been noted a polymorphism of microorganisms. Pure cultures of the *M. bovis Vallee* strain KMIEV-9KM on the Soton-KF and Soton-HB media in smears, colored by the Till-Nielsen method have the appearance of

red-colored sticks. On the MPA and MPB the strain does not grow; it grows on egg and potato nourishing media only at 37 °C. Cultures' colonies are dry, small, ivory-white. The growth rate in the subculture is 10-20 days. A fragile film without medium's turbidity is formed on the liquid nutrient media surface.

Subsequently, the terms of the beginning of growth, the film formation (continuous growth) and the weight of the accumulated bacterial production strains mass have been determined. For this purpose, cultivation and accumulation of mycobacterium bacterial mass of strains *M. bovis Vallee* KMIEV-9 and *M. bovis Vallee* KMIEV-9KM on the Soton HB medium were carried out. Culture *M. bovis Vallee* KMIEV-9KM began to grow (2.0 ± 0.1) days earlier, giving more than (6.0 ± 0.1) mg of bacterial mass accumulation. The microbial film was formed (4.5 ± 0.2) days earlier, in comparison with the initial strain *M. bovis Vallee* KMIEV-9. The results of research have been used for depositing production strains in the Depository of the State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains (Kyiv, Ukraine). The certificates of the initial deposition of the production strain *M. bovis Vallee* KMIEV-9 under the number 538 and the production strain *M. bovis Vallee* KMIEV-9KM under the number 539 were obtained.

The next stage of the research was the working out of the production strains culture medium in order to obtain PPD-tuberculin for mammals. For this purpose, the Soton HB medium has been elaborated in the laboratory setting of the Kherson biological factory. The Soton HB medium has been taken as a basis by the Indian company *HIMEDIA* prescription. This medium modification was to add B vitamin ingredients as growth factors to the basic composition. The synthetic nutrient Soton XB medium using in the PPD-Tuberculin for mammals production has accelerated the growth of the TB pathogen cultures of production strain *M. bovis Vallee* KMIEV-9KM at (2.0 ± 1.0) days and the bacterial mass of mycobacteria accumulation on (5.8 ± 1.9) mg, increasing the yield of tuberculin per medium volume unit.

The next stage of the research was the development and the manufacturing application of the production of PPD-Tuberculin for purified mammals technology, meaning the experimental and production series drug manufacturing. 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 µm 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 µm pore diameter. The protein from the suspension was separated from the liquid by our proposed ultracentrifugation method at 14,000 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 tuberculo-protein 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 protein weight part to ($0,6 \pm 0,1$) mg / cm³. The drug was sterile and highly purified.

The fourth stage of the work was the working out of the specific and harmless to animal and human's health method of PPD-tuberculin for mammals purified activity determining, the carrying out of experiments on guinea-pigs and cattle using inactivated bacterial mass *M. bovis*. Animals, immunized (sensitized) by the BCG vaccine strain culture, was used as a control. The drug was controlled in accordance with the requirements of DSTU 4664: 2006: "Tuberculin purified for mammals in standard solution". According to the created process development, in 2015 and 2016, experimental series No. 1 (E) and No. 2 (E) PPD-tuberculin for purified mammals were produced at the Kherson State Enterprise - the biological factory. It is proved that the received series of the drug are active and suitable for an allergic study on tuberculosis. The tuberculin series No. 1 (E) and No. 2 (E) activity was 49000 IU / mg and 47000 IU / mg in International Units (IU), respectively.

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.

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* КМІЭВ – 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* КМІЭВ–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 підібрано 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. Кассич, В. Ю., Левченко, А. Г., Байдевятов, Ю. А., Ребенко, Г. І., Головка, В. О., **Кассич, 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 № 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. Кассич, **О. В. Кассич**, 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 № 63246 U, МПК C12N 1/20, C 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 № 108460 від 25.07.2016 «Спосіб визначення активності очищеного (ППД) туберкуліну для ссавців на тваринах, сенсibilізованих 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 № 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 № 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).*

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ	17
ВСТУП	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ ТА ВИБІР НАПРЯМКІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	26
1.1 Мікобактерії, їх ультраструктура, диференціація та епізоотологічне значення	26
1.1.1 Роль мікобактерій в патології людей та тварин	26
1.1.2 Таксономія, морфологія та біологічні і культуральні властивості мікобактерій	27
1.2 Епізоотологічний моніторинг туберкульозу тварин	32
1.2.1 Епізоотологічна ситуація з туберкульозу тварин в Україні	32
1.3 Алергічна діагностика туберкульозу та засоби для її проведення в Україні і країнах Європейського співтовариства	40
1.3.1 Алергічна діагностика туберкульозу та інших зоонозів	40
1.3.2 Алергія та гіперчутливість сповільненого типу	41
1.3.3 Алергени та алергічні дослідження	43
1.3.4 Стандартизація туберкулінів для ссавців	46
1.3.5 Вдосконалення технології виготовлення ППД- туберкуліну	48
1.4. Висновок з огляду літератури	52
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ	55
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	63
3.1 Адаптація, селекція, депонування та впровадження у виробництво ППД-туберкуліну для ссавців очищеного виробничих штамів <i>M. bovis Valle KMIEB-9</i> та <i>M. bovis Vallee KMIEB-9KM</i>	63
3.2 Розробка живильних середовищ для промислового культивування	

мікобактерій виробничих штамів <i>M. bovis</i> Vallee KMIEB-9 та <i>M. bovis</i> Vallee KMIEB-9KM	72
3.2.1 Синтетичне живильне середовища Сотона КФ для прискореного росту мікобактерій при виготовленні туберкуліну	72
3.2.2 Синтетичне живильне середовище Сотона ХБ для виробничого культивування мікобактерій в процесі виготовленні ППД туберкуліну	74
3.3 Оптимізація технологічних методів виготовлення ППД-туберкуліну	78
3.3.1 Розробка способу виготовлення ППД-туберкуліну з використанням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування	78
3.4 Розробка способу контролю активності ППД-туберкуліну очищеного для ссавців з використанням авірулентних <i>M. bovis</i>	93
3.4.1 Визначення активності дослідних серій ППД-туберкуліну для ссавців очищеного на великій рогатій худобі	93
3.4.2 Визначення активності дослідних серій ППД-туберкуліну для ссавців очищеного на мурчаках	97
3.5. Контроль якості експериментальної серії ППД-туберкуліну для ссавців	103
3.5.1. Висновок до розділу 3	108
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	109
ВИСНОВКИ	122
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	125
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	126
ДОДАТКИ	179

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

M. bovis – *Mycobacterium bovis*

ППД (*PPD*) – пурифієд протеїн дериват (Purified Protein Derivatіv)

АТК – альттуберкулін Коха

HCSM – heat culture synthetic medium – високоочищений, одержаний на синтетичному живильному середовищі за технологією АТК безальбумінний туберкулін

МО – міжнародна одиниця активності туберкуліну (0,000028 мг активної речовини)

ГЧСТ – гіперчутливість сповільненого типу

ЄС – Європейське співтовариство

МПБ – м'ясопептонний бульон

МПА – м'ясопептонний агар

ТГС – тіогліколієве середовище

M – середнє арифметичне

m – похибка середнього арифметичного

ІФА –імуноферментний аналіз

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

МЕБ – міжнародне епізоотичне бюро

ВООЗ – всесвітня організація охорони здоров'я

ДП – державне підприємство

БЦЖ (*BCG*) – бактерії Кальметта та Герена (*Bacillus Calmette –Guerrin*)

МБ – мікобактерії

ВРХ – велика рогата худоба

ТХО – трихлороцтова кислота

РЕМ – растровий електронний мікроскоп

ДВФСУ – Державна ветеринарна та фітосанітарна служба України

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Серед зоонозних захворювань туберкульоз за своїм соціальним, економічним епізоотологічним та епідеміологічним значенням займає особливе місце. 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. Боротьба з цією хворобою має не тільки економічне, але й соціально-гігієнічне та епідеміологічне значення [2, 4, 30-31, 44-46, 59, 71, 72, 100-103, 133, 135, 137, 166, 174-176, 128-130, 181-183, 220-223, 241, 242].

Документи МЕБ характеризують туберкульоз великої рогатої худоби як хронічне бактеріальне захворювання тварин та людей, розповсюджене по всьому світу, яке являється однією з проблем здоров'я суспільства. У зв'язку з цим Закон України «Про протидію захворюванню на туберкульоз» одночасно з заходами в системі охорони здоров'я передбачає необхідність своєчасного виявлення хворих на туберкульоз сільськогосподарських тварин.

За даними О. Н. Шарова (1989), М. П. Овдиенка (1997), Ю. Я. Кассіча (2001, 2002, 2003), В. О. Бусола (2006, 2008) успіх боротьби з туберкульозом визначається багатьма факторами, найважливішим з яких є своєчасне проведення діагностичних заходів, направлених на виявлення та вилучення зі стад хворих тварин, які являють собою основне джерело збудника хвороби [30-31, 181-183, 220-223, 135, 137, 241, 242].

Основним прижиттєвим методом масової діагностики туберкульозу в Україні, як і в більшості країн світу, є туберкулінова проба [135, 137, 174-176, 181-183, 241, 242].

Документи МЕБ та ЄС в якості основного методу для 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 фахівцями лабораторії туберкульозу ННЦ ІЕКВМ [64, 70, 72, 114, 115, 128-130, 145, 146, 148], який виготовляють з використанням виробничого штаму *Mycobacterium bovis* ІЕКВМ-1. Застосування туберкуліну дозволяє виявляти інфікованих та хворих на туберкульоз тварин на різних стадіях інфекційного та епізоотичного процесів.

Мікобактеріальні алергени (сенситини) являють собою багатокомпонентну систему, основною діючою та специфічною речовиною якої є протеїни (Seibert F., 1934). Рівень вмісту баластних речовин, які знижують рівень специфічності препарату, обумовлений технологією його виготовлення [16-21]. Вдосконалення технології виготовлення діагностиків може бути ефективним лише в комплексі з використанням міжнародних стандартів та застосуванням нормативних документів України, гармонізованих з рекомендаціями та вимогами МЄБ, ВООЗ та ЄС.

За даними Н. С. Шевирева з співав. (1999, 2006), Л. Є. Корнієнка (2006), В. М. Безгин з співав. (1999, 2006, 2012), Н. В. Безгиної з співав. (2006, 2008) В. Е. Козлова з співав. (2004, 2007) 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, знизити використання води та втрати протеїну » [16-21, 149-150, 154, 243, 244].

Широкий імпорт – експорт тварин та продукції тваринництва потребує уніфікації методів і засобів діагностики туберкульозу для одержання рівноцінних результатів досліджень в різних регіонах світу. Тому активність та специфічність препарату мають бути стандартизованими величинами.

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 *Mycobacterium bovis* «AN5» або «Vallee» [148]. Тому, на сьогоднішній день актуальним напрямком досліджень є гормонізація вітчизняних ППД-туберкулінів у відповідності до вимог ЄС.

До того ж, згідно Законів України [77-80] усі закупівлі в Державі здійснюються на тендерній (конкурсній) основі, за принципами добросовісної конкуренції серед учасників, максимальної економії та ефективності, об'єктивної та неупередженої оцінки пропозицій конкурсних торгів, свободи надання послуг, тощо, в той час як ППД-туберкуліни в Україні нині виготовляє лише одне підприємство. Таким чином, розробка, впровадження та випуск ППД-туберкуліну для ссавців крім Сумської, ще й на Херсонській державній біологічній фабриці, сприяє впровадженню Державної політики тендерних закупівель.

Перелічені факти переконливо свідчать, що тваринництво України при поголів'ї великої рогатої худоби близько 4 млн. голів потребує щорічного виготовлення та використання значної кількості високоактивних та специфічних ППД-туберкулінів для ссавців та птиці, які відповідають вимогам Європейського співтовариства і забезпечують якісне та ефективне алергічне дослідження худоби на туберкульоз.

Наведені матеріали свідчать про те, що на сьогоднішній день для ветеринарної медицини України актуальним напрямком досліджень є пошук та впровадження у виробництво високопротеїногенних виробничих штамів *Mycobacterium bovis* для виготовлення туберкуліну, розробка ефективних і високопродуктивних живильних середовищ для їх культивування, а також оптимізація технології виготовлення і контролю, розробка нових та гормонізація 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, початок квітень 2016 р., закінчення грудень 2020 р.), Сумського національного аграрного університету «Епізоотологічний моніторинг та вдосконалення засобів діагностики туберкульозу тварин» (номер державної реєстрації 0110u007591; початок вересень 2010 р., закінчення жовтень 2014 р.) та «Створення іноваційних 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 0 0115V001053, 2015–2019 рр.)

Мета і завдання дослідження: Метою роботи був відбір та впровадження у виробництво високопротейногенних 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 у відповідності з вимогами ЄС.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі задачі:

- одержати, дослідити властивості, провести депонування виробничого штаму *Mycobacterium bovis Vallee* в депозитарії ДНКІБШМ та впровадити його у виробництво для виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців, що відповідає вимогам ЄС;
- 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: електронномікроскопічні, бактеріологічні (мікроскопічні, культуральні, біологічні), імунологічні, 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 отриманих результатів. Вперше в Україні дисертантом були розроблені, задепоновані та використані для виготовлення дослідно-виробничих серій ППД-туберкуліну для ссавців очищеного виробничі штами *M. bovis Vallee* KMIEB-9 та *M. bovis Vallee* KMIEB-9KM (Патент на корисну модель «Виробничий штам *M. bovis Vallee* KMIEB-9KM для виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців» за № 109231, виданий згідно заявки № а201505875, пріоритет від 5.08.2016 року (Додаток Г); Свідоцтво про первісне депонування штаму мікроорганізмів *M. bovis Vallee* KMIEB-9 в Депозитарії ДНКІБШМ за № 538 від 03.03.2011 (Додаток Б); Свідоцтво про первісне депонування штаму мікроорганізмів *M. bovis Vallee* KMIEB-9KM в Депозитарії ДНКІБШМ за № 539 від 03.03.2011 (Додаток В).

Для адаптації, селекції та накопичення бактерійної маси виробничих штамів розроблені та використані поживні середовища: «Синтетичне живильне середовище Сотона КФ для прискореного накопичення бактеріальної маси мікобактерій» (Патент на корисну модель 63246 U, МПК C12N 1/20, C 12R 1/32 від 10.10.2011 (Додаток Д) та «Синтетичне живильне середовище Сотона-ХБ для прискореного росту мікобактерій при виготовленні туберкуліну» (Патент на корисну модель за № 111052, від 25.10.2016 року (Додаток Ж).

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, від 27.03.2017 року, виданого згідно заявки № u201604892 (Додаток К) та «Спосіб виготовлення ППД-туберкуліну з використанням методів мікрофільтрації та ультрацентрифугування» (Патент на корисну модель за № 120698, від 10.11.2017 року, виданого згідно заявки u 2017 08588 (Додаток Л).

Під час проведення контрольних досліджень дослідно-виробничих серій ППД-туберкуліну для ссавців очищеного розроблено «Спосіб визначення активності очищеного (ППД) туберкуліну для ссавців на тваринах, сенсibilізованих авірулентними культурами *M. bovis*» (Патент на корисну модель за № 108460 від 25.07.2016 згідно заявки № a201509959 (Додаток М).

Практичне значення отриманих 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 (Додаток А) та *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ (Свідоцтва про депонування № № 538 та 539 (Додатки Б та В). Для виготовлення алергену розроблені та впроваджені нові технологічні прийоми з використанням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування (Додаток Н). Розроблено та узгоджено

технологічний регламент (інструкція з виготовлення препарату (Додаток П). Матеріали дисертаційної роботи використовуються при викладанні дисциплін інфекційного профілю на факультетах ветеринарної медицини (Додаток Р).

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 Херсонського державного підприємства – біологічна фабрика (Кошельник В. Г., Колеснікова К. Ю., Терпецька Т. О.), яким автор висловлює глибоку подяку, виконав усі експериментальні дослідження. Молекулярно-генетичні та біохімічні дослідження виробничого штаму *M. bovis Vallee KMIEB-9* (Додаток А) 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 вчених 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.,

м.Харків

Публікації. Основні положення дисертації опубліковано 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; 6 патентах України на корисну модель.

Структура і обсяг дисертації. Обсяг основного тексту дисертації складає 5,2 авторських аркуші (125 сторінок комп'ютерного тексту), роботу ілюстровано 12 таблицями, 7 рисунками та 2 схемами і формулами. Дисертація складається з розділів: умовні позначення, вступ, огляд літератури, матеріали і методи виконання роботи, 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.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.

1.1 Мікобактерії, їх ультраструктура, диференціація та епізоотологічне значення

1.1.1 Роль мікобактерій в патології людей та тварин Від людини, домашніх, диких тварин, птиці та з об'єктів довкілля виділено 48 видів мікобактерій. Їх роль в патології неоднакова і вивчена недостатньо. Застосування культуральних, біохімічних та біологічних методів досліджень дає можливість ефективно диференціювати збудників туберкульозу та атипові мікобактерії.

Підтверджена убіквітарність (тобто широке розповсюдження) туберкульозних та не туберкульозних мікобактерій, які виділяються з об'єктів зовнішнього середовища (від 5,1 до 41 % досліджених проб), з біологічного матеріалу від великої рогатої худоби, що реагує на туберкулін (від 4 до 39,4%), від овець (10%), від диких тварин – 21,1% випадків [174-175, 181-183, 226-228].

Серед інфекційних хвороб сільськогосподарських тварин особливе місце належить туберкульозу. Туберкульоз людей і тварин є найбільш розповсюдженою у світі інфекцією (від 0,002% у США до 52% у Перу). Серед домашніх тварин найчастіше хворіє велика рогата худоба [114, 217].

Економічні збитки від туберкульозу худоби складаються з втрат за рахунок зниження продуктивності, передчасного або необґрунтованого забою тварин, утилізації туш, а також за рахунок витрат на оздоровлення скотарських ферм. В Україні в умовах тривалого неблагополуччя з туберкульозу економічні збитки на хвору тварину становлять 585,9 грн. [114, 213, 217].

Оздоровлення тваринництва від туберкульозу має важливе епідеміологічне значення, оскільки хворі тварини можуть бути джерелом

інфекції для людей. Захворюваність людей на туберкульоз бичачого виду у різних країнах становить від 4,3 до 26,5 %. Нині виділено та описано 48 видів мікобактерій. Їх роль в патології неоднакова і вивчена недостатньо [120, 127, 229]. Тому розробка, аналіз, узагальнення, систематизація методів диференціації різних видів мікобактерій та вивчення їх значення в патології є актуальною проблемою.

1.1.2 Таксономія, морфологія та біологічні і культуральні властивості мікобактерій. Згідно сучасної таксономії збудник туберкульозу віднесено до царства *Procariotae*, порядку *Actinomycetales*, родини *Mycobacteriaceae*, роду *Mycobacterium* [6, 94, 95, 125, 228].

До роду *Mycobacterium* (МБ) віднесено 48 видів мікроорганізмів, з яких патогенними для людини та тварин є види: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium paratuberculosis* [114, 128, 168].

Представники інших видів роду *Mycobacterium* здатні сенсibilізувати організм сільськогосподарських та лабораторних тварин, а деякі проявляють патогенність. Ці мікроорганізми одержали назву атипових мікобактерій. Проблема атипових мікобактерій виникла на початку 50-их років 20 сторіччя. В цей час були виявлені захворювання людей, клінічно і рентгенологічно схожі з туберкульозом, в той час як їх збудники відрізнялись від збудників туберкульозу [125, 128, 168, 227]. Атипові мікобактерії не відрізняються від збудника туберкульозу за морфологічними та тінкторіальними властивостями, але суттєво різняться за культуральними, біохімічними та біологічними (вірулентними) ознаками [108, 112, 128-131, 168, 222-224]. Неспецифічні реакції на туберкулін у тварин, сенсibilізованих атиповими мікобактеріями, прийнято називати параалергічними (параспецифічними), а реакції, розвиток яких спричиняють інші фактори (в тому числі невідомі), – псевдоалергічними. Неспецифічні реакції на туберкулін призводять до вимушеного діагностичного забою продуктивних тварин, що, в свою чергу, спричиняє додаткові економічні збитки [134, 135, 220]. Атипові мікобактерії

різняться за швидкістю росту на живильних середовищах при температурі 22-37 °C; по морфології колоній, їх пігментації і фоточутливості, по каталазній та пероксидазній активності; по чутливості до протитуберкульозних хіміотерапевтичних препаратів; по вірулентності до лабораторних тварин та іншим ознакам. Здатність атипових мікобактерій сенсibilізувати організм тварин до туберкуліну пояснюється їх антигенною спорідненістю із збудником туберкульозу [74, 128, 129].

Атипові мікобактерії при потраплянні в організм великої рогатої худоби спричиняють інфекційний процес, що характеризується імунобіологічною перебудовою і сенсibilізацією тварин до туберкуліну, проте швидко (як правило протягом 30-45 діб) елімінуються, після чого параалергічні реакції зникають. При цьому класичного епізоотичного процесу не спостерігається. Атипові мікобактерії потрапляють в організм худоби тільки з об'єктів зовнішнього середовища (корма, вода, торф'яна підстилка), не передаються від тварини до тварини, не спричиняють захворювання на туберкульоз, але обумовлюють сенсibilізацію організму тварин, що призводить до прояву неспецифічних (параалергічних) реакцій на туберкулін.

Р. А. Нуратінов з співав. (1998, 2009) на великому експериментальному матеріалі довели здатність спричиняти сенсibilізацію худоби до туберкуліну ще й мікроорганізмів, що відносяться до родів *Nocardia* та *Rodokok* [177, 178].

М. О. Баратовим (2010, 2011, 2017). доведена роль коринебактерій у виникненні неспецифічних реакцій на туберкулін і розроблено комплексний алерген для диференціації таких реакцій [11-14].

А. Лазовська повідомляє про сенсibilізацію худоби до туберкуліну коринебактеріями [155, 156].

А. І. Завгородній, С. А. Позмогова з співав. (2009) повідомляють про етіологічну роль атипових мікобактерій групи *M. avium-intracellulare* при хворобах риб [62].

M. Ridell (2000), К. Н. Слина (2009), *M. B. Goren* (2009), *Gordon* (2009) роблять висновок про необхідність диференціювати туберкульоз тварин від нокардіоформних, родококових та актиномікозних інфекцій [215, 322].

И. В. Емельянов (2005) наголошує на необхідності диференціювати туберкулінові реакції при туберкульозі, спричиненому *M. bovis* та мікобактеріями, виділеними від маралів [84].

В лабораторіях ветеринарної медицини України видову належність виділених культур мікобактерій до 1975 року визначали методом Вольферса-Демеля, а після – за методом А. П. Алікаєвої. Усі виділені культури збудників туберкульозу і атипові мікобактерії мають характерні для них морфологічні, тінкторіальні, культуральні та біологічні властивості [115, 125, 213, 271], що послужило основою для розробки методик їх диференціації за означеними параметрами які використовуються дослідниками та діагностичними закладами гуманної і ветеринарної медицини в своїй повсякденній діяльності. Проте, Є. Є. Курдано (2010), М. Д. Калашник (2016, 2017) та інші дослідники наголошують на необхідності вдосконалення методів бактеріологічної діагностики туберкульозу тварин [88-90, 156, 157, 201, 271].

Академік НААН України В. П. Романенко з співав. та деякі інші дослідники вважають, що різні види мікобактерій туберкульозу є різновидністю одного й того ж мікроорганізму. На його думку, в результаті тривалого перебування в організмі невластивого хазяїна патогенні мікобактерії туберкульозу втрачають ряд вихідних властивостей і набувають ознак, характерних для виду збудника туберкульозу, специфічного для тварин, через організм яких вони пасажувались [204].

Проте *L. G. Wayne*, на основі аналізу нуклеїнових кислот, кількісної таксономії та серологічних досліджень довів, що атипові мікобактерії є самостійними видами, а не мутантами *M. tuberculosis* [351].

Основним збудником туберкульозу великої рогатої худоби є *M. bovis* — збудник туберкульозу бичачого виду. Він патогенний і для інших свійських,

диких та хутрових тварин, а також людини і деяких птиць (птиці малосприятливі) [94, 95].

M. tuberculosis – основний збудник туберкульозу людини. Патогенний і для приматів, собак, папуг; слабопатогенний для великої рогатої худоби кролів, кіз [128].

M. avium – основний збудник туберкульозу свійської та дикої птиці, патогенний для свиней, викликає сенсibiliзацію до туберкуліну великої рогатої худоби та мікобактеріози у людей. Згідно класифікації Раніону *M. avium* віднесено до атипових мікобактерій (3 група – нефотохромогенні мікобактерії) [74, 81, 94, 275].

В. О. Бусол та В. М. Мазур (2011) визначили та вивчили епізоотологічне значення та біологічні властивості мікобактерій, виділених від ондатр.

Польські дослідники *I. Orłowska, M. Krajewska, E. Augustynowicz-Kopeć* та ін. (2016) визначають окремий вид *Mycobacterium caprae* у серн та бізонів [347, 348].

Н. М. Мандро з співав. (2001) та Н. М. Александров (2010) виділили та дослідили *M. bovis* за туберкульозу маралів [5, 167].

Мікобактерії спирто – кислото – лугостійкі мікроорганізми, нерухливі, джгутиків не мають; спор та капсул не утворюють. Культивуються мікобактерії в аеробних умовах на елективних живильних середовищах: Петран'яні, Гельберга, Левенштейна-Ієнсена, Фінн-2, ФАСТ-3Л, Павловського та інших. Ростуть МБ дуже повільно: людського виду впродовж 20-30 діб, бичачого – 20-60 діб. Культури *M. avium* з патологічного матеріалу ростуть швидше, ніж *M. bovis* та *M. tuberculosis* – 10-15 діб [6, 8, 94, 95].

Мікобактерії туберкульозу бичачого виду досягають довжини 1,5-3,5 і товщини 0,3-0,5 мкм. Частіше зустрічаються паличкоподібні форми прямі або вигнуті, з заокругленими краями та зернистістю. Зустрічаються також овоїдні та кокоподібні мікобактерії [128, 168, 271].

На елективних поживних середовищах *M. bovis* ростуть дуже повільно (впродовж 20-30 діб) у вигляді гладеньких (S-форма) та шорстких крихкуватих (R-форма) матових колоній або скупчень, а також у вигляді зморшкуватого нальоту білого, кремового, або біло-жовтого кольору (суцільний ріст).

Мікобактерії людського виду більш довгі, тонкі та стрункі. Культури ростуть у вигляді сферичних колоній частіше в R- (шорсткі), рідше в S-формі.

Мікобактерії пташиного виду дуже поліморфні: мають вигляд коротких та довгих паличок, в мазках розташовані скупченнями [128, 168, 230].

Видову належність збудника визначають на основі вивчення культурально-морфологічних та біохімічних властивостей, біологічними дослідженнями (шляхом визначення вірулентності для різних тварин та птиці) та методом ПЛР [91, 92, 185, 214, 219, 242].

Головним методом визначення видової належності збуднику туберкульозу є зараження їм лабораторних тварин (морських свинок, кролів) та курей.

M. bovis впродовж трьох місяців при експериментальному зараженні спричиняє генералізований туберкульоз морських свинок та кролів.

M. tuberculosis спричиняє генералізований туберкульоз морських свинок, а в кролів виникають лише окремі туберкульозні вузлики в легенях та нирках.

M. avium не патогенний для морських свинок, патогенний для птиці, кролів і свиней. У кролів при внутрішньовенному зараженні викликає септичну форму хвороби із збільшенням селезінки без утворення специфічних вузликів (тип Ієрсена). Тварини гинуть впродовж 2 тижнів [128, 168, 230, 231, 275].

Розроблено метод видової ідентифікації збудника туберкульозу у ПЛР. Про діагностичну цінність цього методу повідомляють А. Н. Шаров з співав. (1999, 2000), И. П. Суханов (1999), Е. П. Осипова (2004), М. С. Калмикова (2007), А. В. Скрипник (2007), В. М. Калмиков (2013) та інші автори. Проте,

на сьогоднішній день, метод ПЛР при діагностиці туберкульозу не знайшов широкого використання, оскільки достовірний результат дає лише при дослідженні чистих культур мікобактерій, одержаних шляхом бактеріологічних досліджень загальноприйнятими методами. При цьому геномну ДНК з культур мікобактерій виділяють хімічними, механічними методами або за допомогою ферментів. За даними J. Sambrook. З співав. (1989); Б. Т. Стегній з співав. (2006) класичним прикладом хімічного способу є фенол-хлороформна екстракція [91, 92, 185, 214, 218, 219, 241, 242].

1.2 Епізоотологічний моніторинг туберкульозу тварин.

Туберкульоз (*Tuberculosis*) – це хронічне інфекційне захворювання людини, тварин та птиці, що характеризується утворенням у різних органах дрібних специфічних безсудинних вузликів (туберкулів), схильних до казеозного (сирного) некрозу та звапнення. На серозних оболонках з туберкулів з часом утворюються структури, що нагадують перлинні грона («перлинниця», «перлинна хвороба») [128, 168, 230]. Серед інфекційних хвороб туберкульоз ВРХ займає особливе місце, оскільки завдає значні економічні збитки тваринництву і створює постійну небезпеку для здоров'я людей. Туберкульоз займає перше місце в структурі смертності населення від інфекційних хвороб. У зв'язку із цим у квітні 1993 року ВООЗ оголосила туберкульоз «глобальною надзвичайною небезпекою» [77].

1.2.1 Епізоотологічна ситуація з туберкульозу тварин в Україні. За даними Міністерства охорони здоров'я в Україні з 1995 року триває епідемія туберкульозу серед населення, яка має тенденцію до поширення [7, 76, 77, 82, 83, 232]. Тенденція до поширення туберкульозу людини має місце і в інших регіонах колишнього Радянського Союзу [3, 4, 6, 56, 229, 295]. Напруженою епідемічна ситуація з туберкульозу лишається в Російській федерації (особливо регіоні Сибіру та Дальнього сходу) та деяких інших країнах СНД [4, 155, 156, 229, 295]. Важливим аспектом неблагополуччя епідеміологічної ситуації з туберкульозу серед людей є набуття

мікобактеріями – збудниками туберкульозу та мікобактеріозів стійкості до лікарських засобів на фоні масового застосування антибіотиків [15, 56, 236, 240].

Епізоотична ситуація з туберкульозу великої рогатої худоби в господарствах України, навпаки, значно поліпшилась, що пояснюється, з одного боку, ретельним виконанням ветеринарними і господарськими структурами заходів з боротьби із хворобою, а по-друге – значним зниженням поголів'я (28 млн. голів ВРХ у 1993 році – близько 4 млн. голів у 2017 році) [115, 127, 174].

До туберкульозу сприйнятливі багато видів домашніх і диких тварин, у тому числі хутрові звірі та птиця (більше 55 видів ссавців тварин і близько 50 видів птахів). Більш чутливі до туберкульозу велика рогата худоба, свині, з птахів – кури. Рідше хворіють собаки, кішки, качки, гуси, як виняток – коні, вівці, віслюки. Джерело збудника інфекції – латентно чи хронічно хворі тварини, які виділяють мікобактерії з фекаліями, мокротою, молоком, а при ураженні сечостатевої системи – зі спермою. Збудник туберкульозу тривалий час може зберігатися в організмі у вигляді *L*-форм. Такі тварини часто залишаються невиявленим джерелом збудника туберкульозу. У несприятливих умовах *L*-форми мікобактерії можуть реверсувати у вихідний вид (у класичну форму мікобактерії) і стають причиною виникнення туберкульозу [56, 73, 114, 128, 222].

Результати досліджень Н. М. Мандро та А. С. Донченко (2001), що спираються на матеріали, отримані свого часу, С. Н. Вишелеским, М. К. Юсковцом, І. В. Поддубським, В. Е. Щуревським, В. П. Урбаном, А. С. Донченком, Н. П. Овдиенком, А. Н. Шаровим, Д. Д. Новаком, С. Н. Щепиловим, Н. А. Александровим, Ю. Я. Кассічем, В. С. Федосєєвим, А. І. Кузіним, Г. Ф. Коромисловим, Б. Я. Хайкіним, М. А. Сафінім, Н. М. Количевим, С. І. Джупиною, доповнюють деякі аспекти теорії епізоотичного процесу і саморегуляції паразитарних систем з активним проявом джерела збудника інфекції серед сільськогосподарських та диких

тварин (косуль, маралів) та фактором передачі — орибати́дних кліщів. Сукупність цих біологічних об'єктів являє собою резервуар збудника інфекції. Встановлена природна осередковість (вогнищевість) туберкульозу диких жуйних, доведена важлива роль диких тварин в стаціонарності туберкульозу ВРХ в ряді неблагополучних пунктів, де причину повторних спалахів інфекції встановити раніше не вдавалось. Н. М. Мандро та О. С. Донченко (2001), А. Н. Александров (2010) та інші дослідники наголошують, що вивчення екології різних видів мікобактерій у тварин та в об'єктах довкілля дозволяє визначити ступінь активності збудника в прояві епізоотичного процесу. Таке теоретичне обґрунтування може бути використане для всебічного вивчення прояву епізоотичного процесу як при туберкульозі, так і при інших інфекційних захворюваннях [5, 51, 167].

В. О. Бусолом, з співав. (2001, 2002, 2003, 2011), О. С. Донченком з співав. (2004), М. П. Овдієнком з співав. (2004) та іншими дослідниками проведено порівняльний епізоотологічний моніторинг та вивчено закономірності еволюції напруженості епізоотичного процесу поширення туберкульозу великої рогатої худоби в межах всього світу. Встановлено географічний зв'язок між показниками епізоотичності та природним розселенням ондатри, а також напруженості епізоотичної ситуації в просторі та часі з сонячною активністю (за одиницями Вольфа). Визначено епізоотологічне значення та біологічні властивості мікобактерій, виділених від диких тварин [30, 31, 50, 180-183].

Специфічні засоби профілактики туберкульозу для тварин не розроблені. Лікування хворої на туберкульоз худоби заборонене [229, 230, 231]. За даними Н. М. Мандро та О. С. Донченко (2001) в Росії для профілактики туберкульозу ВРХ та маралів застосовують вакцину БЦЖ [48-50, 167].

Основними методами діагностики туберкульозу є: захиттєвий — клінічний огляд, внутрішньошкірна туберкулінова проба (алергічні дослідження), а у коней — офтальмопроба та посмертний — патологоанатомічне та бактеріологічне дослідження [128, 230, 231].

У благополучних господарствах проводять обов'язкові планові одноразові алергічні дослідження (туберкулінізацію) всього поголів'я при епізоотологічних (епідеміологічних) показниках і перед продажем тварин на племінні чи виробничі цілі. У великої рогатої худоби діагноз на туберкульоз вважають встановленим, а стадо неблагополучним, якщо: виявлено патологоанатомічні зміни, властиві туберкульозу, хоча б у однієї тварини при діагностичному забої; виділено збудника туберкульозу (*M. bovis*, *M. tuberculosis*) при культуральному дослідженні біоматеріалу, відібраного від реагуючих на туберкулін тварин, або при позитивній біологічній пробі на лабораторних тваринах; диференційовано видову належність виділених культур до збудників *M. bovis*, *M. tuberculosis* за допомогою ПЛР і підтверджено бактеріологічним методом захворювання тварин на туберкульоз [128, 230].

Масовому поширенню туберкульозу на фермах сприяють чинники, що знижують резистентність організму тварин. До них відносяться: неповноцінна годівля, посилена продукція молока без компенсації необхідних життєво важливих для організму мікроелементів, вітамінів, амінокислот, відсутність регулярного моціону на свіжому повітрі, тіснота і вогкість у приміщеннях, антисанітарні умови утримання тварин [46, 128, 230, 231].

Нині надзвичайно актуальним та перспективним напрямом боротьби з туберкульозом тварин є знищення збудника в зовнішньому середовищі [63, 104, 105, 187-189, 218]. В. Ю. Кассіч з співав. (2008, 2010) Б. Т. Стегній з співав. (2010, 2015), А. І. Завгородній з співав. (2010, 2016), А. П. Палій з співав. (2013, 2014, 2015, 2017) повідомляють, що з цією метою розробляються, випробовуються та впроваджуються в технологію тваринництва сучасні дезінфекційні засоби та методи їх застосування [67, 104, 105, 189, 219].

За напруженістю епізоотологічної ситуації щодо туберкульозу Україна належить до групи з особливим статусом стаціонарності інфекції. За даними

О. А. Ткаченка з співав. (2012, 2014, 2016) епізоотологічний моніторинг туберкульозу великої рогатої худоби свідчить, що понад 100 років територія сучасної України залишалась неблагополучною з цього захворювання [221-224].

Проте, за даними В. Ю. Кассіча, з 1976 по 1980 роки відзначене стабільне поліпшення епізоотичної ситуації з туберкульозу ВРХ: кількість неблагополучних пунктів зменшилась з 987 до 262, відповідно. У 1996 році відзначено зменшення неблагополучних пунктів до 149. На кінець 2003 року, за даними Інституту лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, в Україні залишилось 29 неблагополучних щодо туберкульозу ВРХ пунктів [96, 98, 107].

Захворюваність великої рогатої худоби на туберкульоз становила у 1976 році 0,43%, у 1981 році – 0,23%, у 1985 році досягла 0,4%. У 1986 та 1987 роках захворюваність тварин на туберкульоз становила 0,43 % та 0,38 %, відповідно. У 1991-1996 роках захворюваність знизилась до 0,13-0,15% [114, 115].

Проведений А. І. Завгороднім, В. В. Білушко та І. М. Дегтярьовим аналіз матеріалів ветеринарної звітності за період із 1996 по 2006 рр. свідчить, що найбільша кількість неблагополучних щодо туберкульозу ВРХ господарств була зареєстрована у 1998 р. та становила 194 господарства. У 2006 р. значно зменшилась кількість неблагополучних пунктів щодо туберкульозу ВРХ — до 29 господарств, що у 6,6 разу менше порівняно з 1999 р. [52, 53, 22-25, 57-60].

На кінець 2006 р. були оздоровлені від захворювання на туберкульоз ВРХ тваринницькі господарства Волинської, Закарпатської, Львівської, Рівненської, Івано-Франківської, Тернопільської та Чернівецької областей, а в АР Крим поголів'я ВРХ більше ніж 35 років було благополучним щодо туберкульозу. [114, 115, 127].

При вивченні епізоотичної ситуації щодо туберкульозу ВРХ у господарствах України визначено, що в ряді неблагополучних щодо

туберкульозу ВРХ господарств, після їх оздоровлення знову відбулись спалахи туберкульозної інфекції [128, 132].

В. М. Горжеєв з співав. (2003, 2004, 2005), А. І. Завгородній з співав. (2011), Б. Т. Стегній з співав. (2012), М. І. Гулюкін з співав. (2005–2014) переконливо доводять, що за останні 30 років від реагуючої на туберкулін великої рогатої худоби значно (до 86,2 % від загального числа виділених мікобактерій) збільшилось виділення атипових мікобактерій, зокрема *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. vaccae*, що значною мірою ускладнює проведення діагностичних і оздоровчих заходів, особливо за умов повторного виникнення захворювання на туберкульоз. Доведено доцільність використання комплексного методу діагностики для визначення природи позитивних реакцій на туберкулін у благополучних господарствах, що дозволяє підтвердити або спростувати діагноз на туберкульоз впродовж 60 - 90 діб [38-40, 44-46, 58, 59, 218].

Таким чином, з кінця 90-х років двадцятого сторіччя спостерігається статистично підтверджене покращання епізоотичної ситуації з туберкульозу великої рогатої худоби. Така тенденція відмічена і з початку 21-го сторіччя. Так, на кінець 2008-2010 рр. неблагополучними лишались окремі поодинокі господарства. Аналіз ситуації підтвердив, що такий стан обумовили два головних фактори. По-перше, активне проведення протитуберкульозних заходів із переважним використанням методу здавання на забій неблагополучних щодо туберкульозу тварин. По-друге – різке скорочення поголів'я, як в країні в цілому, так і в окремих господарствах [41, 44, 85, 114]. Завдяки активному проведенню оздоровчих заходів, станом на 01.01.2013 року в Україні лишилось три неблагополучних щодо туберкульозу пункти – по одному в Кіровоградській, Тернопільській і Черкаській областях [358].

Згідно звітних даних Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України за період 1995–2016 рр. захворювання реєстрували у 1381 господарстві 21 області України [89-90]. Найбільш складна епізоотична ситуація з туберкульозу ВРХ була зареєстрована у період 1995–1999 рр.

Захворювання було встановлено у 834 неблагополучних тваринницьких господарствах. Завдяки проведеним у 2000–2004 рр. оздоровчим заходам кількість неблагополучних щодо туберкульозу пунктів зменшилася до 323, а у період 2005–2009 рр. — до 217, що у 2,6 та 3,8 разу менше у порівнянні з 1995–1999 рр.

Спорадичні випадки цього захворювання у 2006–2008 рр. відмічали у господарствах Вінницької, Дніпропетровської, Запорізької, Луганської, Полтавської, Херсонської, Харківської, Черкаської та Чернігівської областей. За період 2010–2015 рр. поодинокі випадки та рецидиви хвороби серед ВРХ були встановлені у 10 господарствах, 9 з них у Київській області, 2, — Сумській, 1 — Кіровоградській, 3 — Тернопільській, 2 — Черкаській. На кінець 2016 р. поголів'я ВРХ у 24 областях було оздоровлено від туберкульозу. Середній індекс захворюваності ВРХ на туберкульоз в Україні за 1995–2016 рр. складав $(0,08 \pm 0,02) \%$ [59, 90, 218].

Станом на 01.10.2016 в Україні реєструвався 1 неблагополучний по туберкульозу ВРХ пункт в Київській області [358, 359]. Станом на 01.04.2017 в Україні не залишилось жодного неблагополучного пункту по туберкульозу [247, 248]. Проте існують цілий ряд господарств, в яких реєструються алергічні реакції на туберкулін і шляхом систематичних алергічних досліджень вивчається епізоотологічна ситуація щодо туберкульозу [359].

Отже, епізоотологічний моніторинг туберкульозу великої рогатої худоби свідчить, що понад 100 років територія сучасної України залишалась неблагополучною з цього захворювання. Однак за період з 1987 року дотепер, епізоотична ситуація з туберкульозу ВРХ в Україні суттєво покращала. За даними державної ветеринарної служби на 01.04.2017 в Україні не залишилось жодного неблагополучного по туберкульозу господарства.

При цьому, треба враховувати, що з 1990 по 2007 роки також значно зменшилось поголів'я великої рогатої худоби (з 24 623,4 тис. голів до 4 423,7

тис. голів відповідно, тобто у 2,6 рази) [115], і на початок 2017 року, становить близько 4 млн. голів [248].

Нині існують цілий ряд господарств, в яких вивчається епізоотологічна ситуація щодо туберкульозу і проводяться систематичні алергічні дослідження. За 2016 рік проведено 3,4 млн. алергічних досліджень на туберкульоз [247, 248]. Обов'язкові планові алергічні дослідження (туберкулінізацію) всього поголів'я великої рогатої худоби проводять у благополучних 5 років і більше господарствах один раз у рік та за епізоотологічних і епідеміологічних показників й перед продажем тварин на племінні чи виробничі цілі. На усіх державних племінних підприємствах, племінних фермах, у приватних племінних господарствах незалежно від строків благополуччя маточне поголів'я великої рогатої худоби досліджують на туберкульоз алергічним методом два рази на рік, а весь молодняк – з 40-добового віку один раз на рік. У господарствах, які постачають молоко в дитячі та медичні заклади, санаторії, будинки відпочинку або для виробництва продукції, що потім експортується, все стадо з 40-денного віку алергічним методом двічі на рік [128, 137, 151]. Тому, тваринництво та ветеринарна медицина України щорічно потребує близько 8 млн. доз активного та специфічного ППД-туберкуліну. Крім того, згідно законодавства України, усі закупівлі в Державі здійснюються на тендерній основі, за принципами добросовісної конкуренції серед учасників; максимальної економії та ефективності; об'єктивної та неупередженої оцінки пропозицій конкурсних торгів; свободи надання послуг, тощо [77-79], в той час як ППД-туберкулін для ссавців в Україні нині виготовляє лише одне підприємство. Таким чином, розробка, впровадження та випуск ППД-туберкуліну для ссавців крім Сумського, ще й на Херсонському державному підприємстві – біологічна фабрика, сприяє впровадженню державній політики тендерних закупівель.

Перелічені факти переконливо свідчать, що тваринництво України при поголів'ї 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 та забезпечує якісне та ефективне алергічне дослідження худоби на туберкульоз.

1.3 Алергічна діагностика туберкульозу та засоби для її проведення

1.3.1 Алергічна діагностика інфекційних хвороб в Україні та країнах Європейського співтовариства. Алергічні дослідження є основним методом прижиттєвої діагностики туберкульозу та інших небезпечних зоонозів з хронічним перебігом (бруцельозу, сапу). Біологічною промисловістю України засоби алергічної діагностики сапу та бруцельозу не виробляються [35]. Для алергічних досліджень на туберкульоз ВРХ, свиней, овець, коней в Україні використовують туберкулін очищені (ППД) для ссавців у стандартному розчині, розроблений фахівцями лабораторії туберкульозу ННЦ ІЕКВМ (Кассіч Ю. Я., Завгородній А. І., Кассіч В. Ю. та інші, 2001, 2002, 2003, 2006, 2012), який виготовляють з використанням виробничого штаму *M. bovis* ІЕКВМ-1. Проте, згідно з Директивою Ради ЄС 97/12 від 17 березня 1997 р., яка є законодавчим актом Європейського співтовариства, туберкулінізацію тварин треба проводити з використанням туберкулінів *PPD* або *HCSM*, які повинні виготовлятися з штамів *M. bovis* «AN5» або «Vallee» [96, 97, 151]. Тому, на сьогоднішній день актуальним напрямком досліджень є гармонізація вітчизняних ППД-туберкулінів у відповідності до вимог ЄС. До того ж, згідно законодавства України [77-79] усі закупівлі в Державі здійснюються на тендерній основі, за принципами добросовісної конкуренції серед учасників, максимальної економії та ефективності, тощо, в той час як ППД-туберкуліни в Україні нині виготовляє лише одне підприємство. Тому розробка, впровадження та випуск ППД-туберкуліну для ссавців крім Сумського, ще й на Херсонському державному підприємстві – біологічна фабрика, сприяє впровадженню державної політики тендерних закупівель.

Наведені матеріали свідчать про те, що на сьогоднішній день для ветеринарної медицини України актуальним напрямком досліджень є пошук та впровадження у виробництво високопротеїногенних виробничих штамів *M. bovis* для виготовлення туберкуліну, розробка ефективних і високопродуктивних живильних середовищ для їх культивування, а також оптимізація технології виготовлення і контролю, розробка нових та оптимізація і гормонізація існуючих вітчизняних алергенів у відповідності з вимогами ЄС.

У зв'язку із сказаним, нами проведений порівняльний аналіз різних виробничих штамів, технологічних прийомів виготовлення й контролю ППД-сенситинів та визначення перспектив подальших досліджень з метою вдосконалення вітчизняних препаратів для алергічної діагностики туберкульозу ссавців.

1.3.2 Алергія та гіперчутливість сповільненого типу

Під алергією розуміють специфічну зміну реактивності організму по відношенню до речовини або збудника, яка виникає за умов гомологічної сенсibiliзації і полягає в підвищенні місцевої або загальної чутливості організму до повторного впливу того ж агенту (П. Ф. Здродовский, 1970).

Алергія являється імунологічним феноменом, захисною реакцією організму, спрямованій 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, ехинококозі, інфекційному ринотрахеїті, лейкозі та деяких інших інфекційних та інвазійних захворюваннях.

Інфекційна алергія – стан підвищеної чутливості організму до введення збуднику 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 [37, 103, 128].

Термін «алергія» широко розповсюджений, проте часто використовується в 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 (ГЧСТ).

ГЧСТ є фактором клітинного імунітету. Реакція характеризується взаємодією сенсibiliзованих лімфоцитів з антигенами мікробної клітини та виділенням медіаторів клітинного імунітету – лімфокинінів [103, 106, 114].

1.3.3 Алергени та алергічні дослідження

Алергенами в 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. Алергени по суті – це неповні антигени, які при введенні в організм не стимулюють гуморальних імунологічних реакцій (напрацювання специфічних антитіл), але призводять до реакцій на рівні клітинного імунітету, які супроводжуються міграцією сенсibiliзованих лімфоцитів до місця введення сенситину. Діагностичні дослідження з використанням алергенів та феномену ГЧСТ називають алергічними [106, 118, 121].

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 результативного досліджень були опубліковані дещо пізніше. У 1890 р. У Варшаві О. Ф. Буйвид почав виготовлення цього алергену і назвав його туберкуліном. Для діагностики туберкульозу у домашніх тварин

туберкулін був вперше застосований у 1891 р. В. Г. Гутманом [114, 128, 130-132].

В СРСР до початку 80-х років 20 сторіччя для алергічної діагностики туберкульозу використовували альттуберкулін Коха (АТК). Недоліком альттуберкуліну є наявність у ньому залишків поживного середовища, які сприяють прояву неспецифічної алергії [114, 128, 168].

HCSM – туберкулін (*heat culture synthetic medium*) – високоочищений, одержаний на синтетичному живильному середовищі за технологією АТК безальбумінний туберкулін. Туберкуліни *HCSM*, зокрема «*Introvaspoly*» фірми «*Miffa Merieux*», використовувались у програмах викоренення туберкульозу у різних країнах Європи. *Directive 80/219* ЕЕС та *OIE Manual of Diagnostic Test* дозволяє застосування *HCSM* на рівні ППД. Недоліком препарату є концентрування за високої температури, що призводить до втрат активних речовин та зниженню специфічності [151, 193, 194, 299].

Для прижиттєвої діагностики туберкульозу тварин та птиці в Україні застосовують сухі очищені (ППД) туберкуліни для ссавців та птиці, а також алерген з атипових мікобактерій ААМ, що виготовляє Сумська біологічна фабрика. Аналогом препарату ААМ є КАМ – комплексний алерген з атипових мікобактерій виробництва Курської біофабрики [114, 128, 168].

Сухий очищений (ППД) туберкулін готують шляхом культивування мікобактерій туберкульозу бичачого виду на синтетичних живильних середовищах. Культури автоклавують, бактеріальну масу утилізують, в культуральний фільтрат додають трихлороцтову кислоту (ТХО) та поспіль сірчаноокислий амоній для осадження протеїнів. Одержаний осад відмивають від залишків солей методом діалізу [59, 114, 137].

Отриманий таким чином препарат являє собою очищений дериват протеїну мікобактерій (*Purified Protein Derivatив – PPD*) – фрагменти молекул туберкулопротеїну. Випускають препарат в ліофілізованому виді або у 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* (1934, 1949) [114, 128].

В подальшому цей метод удосконалений *М. А. Лінніковою* (1959) *О. М. Говоровим*, *Ф. І. Осташком* (1952, 1956) та іншими дослідниками. В СРСР туберкуліни типу ППД були виготовлені для використання в гуманній медицині [109, 163, 235], а також для ссавців [34, 106, 109] та для птиці [18, 19]. Так, *Ф. І. Осташко* запропонував туберкулін (Т-УІЕВ), одержаний осадженням культурального фільтрату збудника туберкульозу трихлороцтовою кислотою (ТХО) або сірчаноокислим амонієм. На думку автора, речовина, що спричиняє алергічну відповідь, являє собою не цілу молекулу туберкулопротеїну, а продукт її гідролізу (дериват) [34, 109, 115]. Розроблений згаданими дослідниками ППД-туберкулін було впроваджено у виробництво на Курській біологічній фабриці, яка виготовляє цей препарат, з деякими удосконаленнями, для потреб тваринництва та ветеринарної медицини, Радянського Союзу, а поспіль – Росії. Нині, туберкуліни для потреб тваринництва України виготовляє Сумське державне підприємство – біологічна фабрика [22, 52, 60, 109, 114].

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 (в Росії та країнах СНГ – 10000±2000 МЕ). Дослід використання в тваринницьких господарствах України такої дози туберкуліну свідчить про її доцільність та ефективність, внаслідок зменшення кількості прояву неспецифічних (параалергічних та псевдоалергічних) туберкулінових реакцій у здорових тварин [102, 115, 137].

Вітчизняний туберкулін виготовляють з використанням виробничого штаму *M. bovis* ІЕКВМ-1. Проте, згідно з Директивою Ради ЄС 97/12 від 17 березня 1997 р., яка є законодавчим актом Європейського співтовариства, туберкулінізацію тварин слід проводити з використанням туберкулінів *PPD* або *HCSM*, які повинні виготовлятися з штамів *M. bovis* «AN5» або «Vallee» [97, 151]. Тому, на сьогоднішній день актуальним напрямком досліджень є гармонізація вітчизняних ППД-туберкулінів у відповідності до вимог ЄС. При цьому, за даними В. Е. Козловаз співав. (2003, 2004, 2006, 2007), штам *M. bovis* AN5, депонований в колекції ФДУ ВГНКИ, за своїми імунобіологічними ознаками ідентичний до штаму *M. bovis* Vallee, відповідає вимогам до виробничих штамів і, поряд із штамом *M. bovis* № 8, може бути використаний для виробництва ППД-туберкуліну для ссавців [149, 150].

Нині роль алергічних досліджень, як основного методу прижиттєвої діагностики є провідною. Проте, діагноз на туберкульоз встановлюють лише за позитивними результатами патологоанатомічних (казеозний некроз, перлинниця) та бактеріологічних і біологічних досліджень (виділення та типізація збудника) [109, 152, 128].

Серед сучасних високочутливих діагностичних методів заслуговують на увагу молекулярно-генетичні (ПЛР) та імуноферментний аналіз (ІФА). За результатами досліджень ряду авторів встановлено, що діагностична ефективність ІФА сягає 80-85 %. ПЛР дозволяє виявити збудника в діагностичному матеріалі та ідентифікувати вид мікобактерій впродовж 2-4 діб. Однак, застосування методу ПЛР є високовартісним, що являється перешкодою для його широкого впровадження у діагностичну практику [88, 198, 214, 242].

1.3.4 Стандартизація туберкулінів для ссавців Основною вимогою для стандартизації туберкуліну є біологічна реакція, інтенсивність якої залежить від кількості активної субстанції, що застосована для цього [23, 61, 103].

Важливим етапом контролю якості при виготовленні ППД-туберкуліну є визначення біологічної активності [22-25, 57-60]. Міжнародні та національні стандарти біологічних препаратів застосовуються коли неможливо отримати вичерпної інформації щодо якості цих речовин за допомогою хімічних і фізичних методів [26, 53, 57, 60]. Як основний контроль діагностичних мікобактеріальних біопрепаратів, за вимогами МЕБ передбачається тест на розвиток у тварин реакції гіперчутливості сповільненого типу (ГЧСТ) при внутрішньошкірному введенні туберкуліну. Однією з головних характеристик якості туберкуліну є біологічна активність, що умовно визначається в міжнародних одиницях дії (МО). Активність визначається порівнянням дослідних зразків туберкуліну з міжнародним стандартом або з національним стандартом, відкаліброваним відносно міжнародного стандарту [22, 61, 115]. Уперше в світі міжнародний стандарт, спочатку для АТК (альт-туберкуліну Коха) був виготовлений у Лондоні і затверджений в 1928 році Організацією охорони здоров'я при Лізі Націй. Біологічна активність цього препарату становила 100 000 IU (*International Unit*) в 1,0 см³ алергену. У подальшому, другий і третій міжнародні стандарти для АТК були виготовлені в Копенгагені (Данія) у 1935 і 1965 рр.

За міжнародний стандарт ППД-туберкуліну була взята серія туберкуліну, що виготовлена *Seibert* у 1940 р. з мікобактерій збудника туберкульозу людського виду (*M. tuberculosis*). Стандарт *PPD-S* був затверджений в 1951 році.

За одиницю активності (туберкулінову одиницю – ТО, у подальшому – міжнародну одиницю (IU, МО) стандарту прийнято 0,000028 мг активної речовини. Цей стандарт туберкуліну виготовляють в ампулах, які містять по 500 000 IU (10,0 мг *PPD* і 4,0 мг % буферних солей) [58, 61, 114].

Національний інститут біологічних стандартів і контролю (*NIBSC*) у м. Вейбриджі (Великобританія) забезпечує для калібровки національних зразків діагностичних препаратів міжнародними стандартами інші країни, в тому числі й туберкуліном очищеним (ППД) для ссавців [103, 106, 149].

У відповідності з Директиваю Ради ЄС 97/12 від 17 березня 1997 р., яка вносить поправки та модернізує Директиву 64/432/ЄЕС туберкулінізацію тварин проводять з використанням туберкулінів *PPD* або *HCSM*. Стандарт ЄС *PPD*-туберкуліну для ссавців надає *Institute voor Dier houderijen Dier gezondheid (ID-DLO), Lelistad, The Netheriands*. *PPD*-туберкулін повинен мати ефективність 50 000 ЕСТ/мл и випускатись в ліофілізованому вигляді в ампулах по 1,8 мг *PPD*. Препарат повинен виготовлятися з штамів *M. bovis* «AN 5» або «Valle» [151, 192, 244, 299].

В. Е. Козловим з співавт. (2003, 2004, 2006, 2007) розроблені еталонні зразки туберкуліну (ППД) для ссавців, стандартизовані відносно Першого міжнародного стандарту туберкуліну (*PPD*) *bovine* та еталонний зразок туберкуліну (ППД) для птиці, стандартизований відносно Першого міжнародного стандарту туберкуліну (*PPD*) *avium*. Автором вперше розроблені принципи стандартизації мікобактеріальних алергенів для диференціальної діагностики туберкульозу, які дозволять проводити оцінку препарату у відповідності до вимог міжнародних нормативних документів [149, 150].

Співробітниками лабораторії туберкульозу ННЦ ІЕКВМ удосконалено технологічну схему виготовлення туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців у стандартному розчині, що дозволяє в біофабричних умовах виготовляти алерген, який за біологічною активністю не поступається національному та міжнародному стандартам. Розроблено методику визначення біологічної активності туберкуліну, яка дозволяє достовірно встановити активність туберкуліну, створити національний стандарт цього алергену та здійснювати контроль якості виробничих серій туберкуліну відповідно до вимог ЄС і МЕБ [22, 27, 59, 60, 244].

В Україні, для проведення стандартизації туберкуліну для ссавців, використовують спеціально відібрану серію рідкого «Туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців у стандартному розчині», яку виготовляють за технологією, розробленою ННЦ ІЕКВМ. З метою отримання власного

національного стандарту туберкуліну для ссавців з більш стабільними властивостями в ННЦ ІЕКВМ розроблено технологію виготовлення сухого (ліофілізованого) ППД-туберкуліну для ссавців, який зберігає біологічну активність і специфічність впродовж значно більшого терміну (4-5 років) ніж туберкулін, що виготовляється у стандартному розчині (2 роки) [25, 58, 103, 137].

1.3.5 Вдосконалення технології виготовлення ППД- туберкуліну

Впродовж тривалого часу ППД-туберкуліни для ссавців готували з трьох штамів збудника туберкульозу бичачого та двох людського виду. У зв'язку з тим, що моноалергени мають вищу активність та специфічність, нині при виготовленні туберкуліну для ссавців використовують штами тільки одного бичачого виду. Так, при виготовленні «Туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців у стандартному розчині» ТУУ 24.00497087.645-2001, використовують виробничий штамм «*M. bovis* ІЕКВМ-1» [103, 106, 115].

За даними В. Е. Козлова з співав. (2003, 2004, 2006, 2007) штамп *M. bovis* AN 5, за своїми імунобіологічними ознаками ідентичний до штаму *M bovis* Vallee, відповідає вимогам до виробничих штамів і, поряд із штамом *M bovis* № 8, може бути використаний для виробництва туберкуліну (ППД) для ссавців [149, 150].

На підприємстві МЗО ЗАО «Біолік» по методиці Ліннікової до 2003 року виготовляли ППД-туберкулін для ссавців [103, 106, 109]. З метою забезпечення тваринництва України препаратами для алергічної діагностики туберкульозу тварин та птиці вітчизняного виробництва колективом авторів (Ю. Я. Кассіч, А. І. Завгородній, П. М. Тихонов, В. В. Доценко, В. Ю. Кассіч , 2001, 2003.) на базі ІЕКВМ УААН та Сумського державного підприємства – біологічна фабрика розроблені «Туберкулін очищений (ППД) для ссавців у стандартному розчині» ТУУ 24.00497087.645-2001), ППД-туберкулін для птиці и аналог комплексного алергену з атипових мікобактерій (КАМ) – алерген з атипових мікобактерій (ААМ) [26, 37, 60]. Препарати для алергічної діагностики туберкульозу тварин та птиці впроваджені у

виробництво, виготовляються Сумським державним підприємством – біологічна фабрика і забезпечують проведення планових діагностичних досліджень на туберкульоз на території України.

Проте, в країнах Європейського співтовариства згідно законодавчого акту – Директиви Ради ЄС 97/12 від 17 березня 1997 р. [151, 124, 194] туберкулінізацію тварин проводять з використанням туберкулінів *PPD* або *HCSM*, виготовлених з виробничих штамів *M. bovis* «AN5» або «Vallee», в той час як при виготовленні «Туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців у стандартному розчині» ТУУ 24.00497087.645-2001, виробничим штамом є «*M. bovis* ІЕКВМ-1. Натомість, встановлено, що штам *M bovis* AN 5 за своїми імунобіологічними ознаками ідентичний до штаму *M bovis* Vallee, відповідає вимогам до виробничих штамів і, поряд із штамом *M bovis* № 8, може бути використаний для виробництва туберкуліну (ППД) для ссавців [36, 149, 194].

О. М. Шаровим з співав. (1999), В. М. Безгиним з співав. (1990, 2016), Н. С. Шевиревим з співав. (1971, 1999) розроблені та вдосконалені промислові технології виробництва біопрепаратів для алергічної діагностики туберкульозу. Сучасна технологічна схема виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців базується на розробках В. Seibert (1934, 1949); М. А. Ліннікової (1959); О. М. Говорова, Ф. І. Осташка (1952, 1956); Ю. Я. Кассіча з співав. (2000, 2001, 2002, 2003). Вона передбачає культивування на рідкому синтетичному живильному середовищі виробничого штаму збудника туберкульозу, стерилізацію бактеріальної маси, одержання з неї та стерилізацію культуральних фільтратів, осадження протеїну розчином трихлороцтової кислоти, 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 [17-19, 95, 97, 100, 149, 150, 237, 241, 243, 244].

А. І. Завгороднім, В. В. Білушком, І. М. Дегтярьовим з співав. (2006, 2009) доведено, що виготовлений з дезінтегрованої ультразвуком бактеріальної маси *M. bovis* туберкулін є специфічним, активним та неактогенним [23-25, 57, 58].

О. С. Донченко, М. П. Овдиенко, М. О. Донченко (2004) пропонують спосіб виготовлення моновидових алергенів атипових мікобактерій одночасно з бактеріальної маси та культурального фільтрату. Використання для виготовлення алергенів як культурального фільтрату, так і озвученої бактеріальної маси мікобактерій та застосування комплексу методів мембранного фракціонування білків дозволяє за рахунок зниження вмісту в ППД-туберкуліні для ссавців баластних антигенів, підвищити специфічність та зменшити реактогенність алергену з одночасним підвищенням виходу кінцевого продукту [49].

В. Ю. Кассічем (2003, 2004, 2007), А. І. Завгороднім, В. В. Білушком, І. М. Дегтярьовим (2006, 2009) розроблені методи отримання ППД-туберкуліну з використанням фільтраційних установок типу УПВ на порожнистих волокнах [52, 53, 101, 102, 114, 137].

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). [164].

В. Е. Козловим з співав. (2004, 2007) визначено, що туберкулін, виготовлений із застосуванням методів мембранного фракціонування з молекулярною масою від 3 до 300 кДа, має найбільшу специфічну активність [149, 150].

В. М. Безгіним та В. Е. Козловим (2006, 2007, 2012) показано, що видалення високомолекулярної фракції з препарату методами мембранного фракціонування підвищує питомий вміст білка та специфічність діагностикума і зменшує реактогенність алергену. Показана перспективність застосування методів мембранної технології з метою збільшення економічної ефективності та екологічної безпеки виробництва [17, 18, 149].

А. А. Гриньовим (1973) та Н. В. Безгиною з співав. (2008) доведено, що застосування методів мембранного фракціонування білків культуральної

рідини мікобактерій дозволяє за рахунок зниження вмісту в туберкуліні баластних антигенів знизити реактогенність алергену [20, 21, 42].

Впровадження мембранних методів в технологію виготовлення туберкуліну (ППД) для птиці дозволило підвищити екологічну безпеку виробництва за рахунок виключення з технології азбестових фільтрів, знизити використання води [16, 18, 149].

Н. В. Безгиною (2008) розроблена технологія виготовлення туберкуліну очищеного (ППД), яка забезпечує сумарне підвищення виходу препарату на 40-50% в порівнянні з виходом алергену при чинній технології [20, 21].

Встановлено, що при виготовленні туберкуліну найбільш вразливою ланкою технологічного процесу є глибинна стерилізуюча фільтрація через азбестові фільтри. Застосування азбестових глибинних фільтрів не дозволяє одержати гарантовано стерильний препарат. Крім того, використання великої кількості глибинних фільтрів призводить до значних втрат білку, що знижує вихід препарату [18-21].

В. Е. Козлов з співав., (2004, 2007) та Н. В. Безгина (2008) розробили та запропонували способи фракціонування туберкулопротеїну на ультрафільтраційних мембранах с *НОММ* 150-1000 кДа [20, 21, 159, 50]. Спосіб дозволяє одержати високоспецифічний, неімуногенний препарат, більш технологічний у виготовленні, а також підвищити вихід туберкуліну. Таке стало можливим завдяки використанню ультрафільтрації та діафільтрації розчину білків, виділених з культуральної рідини, на мембранах с *НОММ* 150 - 1000 кДа та наступній мікрофільтрації білкового розчину на мембранах з розміром пор 0,2 мкм [19, 149, 153, 244]. Автори наголошують, що більшість впроваджених у промисловість мембранних технологій базується на ультрафільтрації, діафільтрації та мікрофільтрації.

Широке впровадження мембранних процесів в біотехнологічне виробництво дозволяє застосовувати нові підходи до виділення та очистки вірусів, білкових фракцій, імунологічно важливих компонентів

мікроорганізмів і перш за все – туберкулопротейнів культуральних фільтратів мікобактерій під час виготовлення ППД-туберкуліну.

1.4 Висновок з огляду літератури

Таким чином, за напруженістю епізоотологічної ситуації щодо туберкульозу Україна належить до групи країн з особливим статусом стаціонарності інфекції. На основі епізоотологічного моніторингу туберкульозу великої рогатої худоби О. А. Ткаченко з співав. (2002, 2013, 2014) переконливо доводять, що понад 100 років територія сучасної України залишалась неблагополучною з цього захворювання [220, 222, 223]. Проте, з кінця 90-х років двадцятого сторіччя спостерігається статистично підтверджене покращання епізоотичної ситуації з туберкульозу великої рогатої худоби. Ця тенденція відмічена і з початку 21-го сторіччя. Такий стан обумовили два головних фактори. По-перше, активне проведення протитуберкульозних заходів із переважним використанням методу здавання на забій неблагополучних щодо туберкульозу тварин. По-друге – різке скорочення поголів'я, як в країні в цілому, так і в окремих господарствах [41, 44, 85, 114]. Станом на 01.04.2017 в Україні не залишилось жодного неблагополучного пункту по туберкульозу [247, 248]. Проте і нині існують цілий ряд господарств, в яких вивчається епізоотологічна ситуація щодо туберкульозу і проводяться систематичні алергічні дослідження. За 2016 рік проведено 3,4 млн. алергічних досліджень на туберкульоз [247, 248].

Алергічні дослідження є основним методом прижиттєвої діагностики туберкульозу великої рогатої худоби та інших видів тварин. Для алергічних досліджень на туберкульоз в Україні використовують туберкуліни очищені (ППД) для ссавців і птиці та алерген з атипових мікобактерій ААМ, розроблені фахівцями лабораторії туберкульозу ІЕКВМ (Кассіч Ю. Я., Завгородній А. І., Білушко В. В., Тихонов П. М., Кассіч В. Ю., Позмогова С. А.). Зокрема, «Туберкулін очищений (ППД) для ссавців у стандартному розчині» ТУУ 24.00497087.645-2001 згідно з нормативною документацією виготовляють з використанням виробничого штаму *M. bovis*

ІЕКВМ-1 [145]. Препарати для алергічної діагностики туберкульозу тварин випускає Державне підприємство – Сумська біологічна фабрика. За якістю та специфічною активністю згадані препарати задовольняють та забезпечують тваринництво України [22-24, 57-60, 100-103, 137, 144, 145].

Проте слід враховувати, що в країнах Європейського співтовариства діє законодавчий акт – Директива Ради ЄС 97/12 від 17 березня 1997 р., згідно якої туберкулінізацію тварин проводять з використанням туберкулінів *PPD* або *HCSM*, які повинні виготовлятися з штамів *M. bovis* «AN5» або «Vallee» [151, 192, 193]. При цьому, В. Е. Козловим (2007) встановлено, що варіант штаму *M. bovis* AN5 за своїми імунобіологічними ознаками ідентичний до штаму *M. bovis* Vallee, відповідає вимогам до виробничих штамів і, поряд із штамом *M. bovis* № 8, може бути використаний для виробництва туберкуліну (ППД) для ссавців [149].

Тому, на сьогоднішній день актуальним напрямком досліджень є оптимізація та гармонізація виробництва вітчизняних ППД-туберкулінів у відповідності до вимог законодавства ЄС (у тому числі й підбір належних виробничих штамів).

Відомо, що при виготовленні ППД-туберкуліну найбільш вразливою ланкою технологічного процесу є глибинна стерилізуюча фільтрація через азбестові фільтри. Застосування азбестових глибинних фільтрів не дозволяє одержати гарантовано стерильний препарат. Крім того, використання глибинних фільтрів призводить до значних втрат білку, що знижує вихід препарату [1, 16, 18, 43, 54, 86, 87, 149, 170].

У зв'язку із сказаним, актуальним та перспективним заходом є впровадження в технологічний процес виготовлення ППД-туберкуліну мембранних технологій, використання методів мікрофільтрації та ультрацентрифугування культуральної рідини та осаду туберкуло протеїну.

На підставі наведених фактів на державному підприємстві – Херсонська біологічна фабрика проведена робота з розробки та впровадження у виробництво ППД-туберкуліну для ссавців очищеного, виготовленого з

використанням виробничих штамів *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 та *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ, а також методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування (сепарування) культуральної рідини та осаду туберкулопротеїнів.

До того ж, згідно законодавства України [77-80] усі закупівлі в Державі здійснюються на тендерній (конкурсній) основі, за принципами добросовісної конкуренції серед учасників, максимальної економії та ефективності, в той час як ППД-туберкуліни в Україні нині виготовляє лише одне підприємство. Таким чином, розробка, впровадження та випуск ППД-туберкуліну для ссавців крім Сумського, ще й на Херсонському державному підприємстві – біологічна фабрика, сприяє впровадженню державної політики тендерних закупівель.

Перелічені факти свідчать, що тваринництво України при поголів'ї великої рогатої худоби близько 4 млн. голів потребує щорічного виготовлення та використання значної кількості високоактивних та специфічних ППД-туберкулінів для ссавців та птиці, які відповідають вимогам Європейського співтовариства і забезпечують якісне та ефективне алергічне дослідження на туберкульоз. Тому нині для ветеринарної медицини України актуальним напрямком досліджень є пошук та впровадження у виробництво нових високопротеїногенних виробничих штамів *M. bovis* для виготовлення ППД-туберкуліну, розробка ефективних і високопродуктивних живильних середовищ для їх культивування, а також вдосконалення технології виготовлення і контролю, розробка нових та оптимізація і гармонізація існуючих вітчизняних алергенів у відповідності з вимогами ЄС.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ.

Дисертаційна робота виконувалась у Харківській Державній зооветеринарній академії та на Херсонському державному підприємстві – біологічна фабрика у в період з 2011 по 2017 роки за схемою представленою в табл.2.1.

Таблиця 2.1.

Етапи виконання експериментальних робіт

Етапи	Виконані роботи
Перший етап	Адаптація, селекція, вивчення морфологічних, культуральних та біологічних властивостей та депонування виробничих штамів <i>M. bovis Vallee KMIEB-9</i> та <i>M. bovis Vallee KMIEB-9KM</i>
Другий етап	Розробка середовищ Сотона КФ та Сотона ХБ для виробничого культивування штамів <i>M. bovis Vallee KMIEB-9</i> та <i>M. bovis Vallee KMIEB-9KM</i> 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 KMIEB-9KM</i> , 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

В роботі використані референтні (вони ж виробничі при виготовленні ППД-туберкуліну для ссавців) штами *Mycobacterium bovis Vallee KMIEB-9*

(Додаток А) та *Mycobacterium bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ, депоновані в Депозитарії ДНКІБШМ. Реєстраційні № № 538 та 539 (Додатки Б, В).

На першому етапі досліджень провели адаптацію, селекцію та відбір виробничих штамів *M. bovis*.

Культивування мікобактерій на синтетичних живильних середовищах Сотона проводили таким чином. На щільних живильних середовищах (Левештейна-Ієнсена, ІЕКВМ, Павловського, живильному середовища для культивування мікобактерій (ТУУ 46.15.063.95), або сухому живильному середовищі для прискореного культивування мікобактерій (Патент Укр. № 54203 А; розробники Кассіч Ю. Я., Кассіч В. Ю. з співав.) вирощували культури збудника туберкульозу бичачого виду *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ за температури 37-38 °С. В якості контролю використовували виробничий штам *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9.

Кожною культурою мікобактерій засівали не менше 50 пробірок живильного середовища. Через 35-60 діб відбирали пробірки з інтенсивним ростом культур, 5-10 % з них досліджували мікроскопічним методом. При цьому мазки з культур фарбували за методом Ціля-Нільсена. При наявності бактеріального забруднення культивування починали знову з вихідних музейних культур, а одержану партію забруднених культур знищували.

Культивували посіви в термостаті при 37-38 °С впродовж 6-8 тижнів. Через 1-2 тижні після пересіву культур середовища перевіряли на чистоту росту мікобактерій візуально за характером росту та мікроскопічним методом. Чисті культури зберігали в холодильнику і використовували для пересівів. Адаптований до середовищ Сотона КФ та Сотона ХБ ізолят чистих культур досліджуваних мікобактерій зі щільних поживних середовищ отримав назву: штам *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ. Фактично він є фенотиповим модифікантом штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9.

Біологічні властивості виробничих штамів вивчали шляхом зараження морських свинок і кролів. Дослідження проводили у відповідності з вимогами інструкції щодо лабораторної діагностики туберкульозу тварин.

Молекулярно-генетичні дослідження в ПЛР, визначення нітроредуктазної реакції, гідролітичної активності, перехресний імуноелектрофорезі з референс-сироваткою *M. 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 (Додаток А).

При радіологічних дослідженнях культуру штаму *M. bovis* Vallee КМІЕВ-9 піддавали гамма-опроміненню стимулюючою дозою γ -випромінення 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), «Исследователь» (джерело випромінювання ^{60}Co , $P=2$ Гр/сек., 2 Гр/год., 4 Гр/хв.), Контролем були неопромінені культури. Опромінення проводили на базі Інституту медичної радіології (м. Харків) під керівництвом інженеру 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). Для електронномікроскопічного дослідження препарати з мікобактерій штаму *Mycobacterium bovis* Vallee КМІЕВ-9КМ, попередньо інактивованого автоклавуванням при 101 °С впродовж 30 хв, або γ -опроміненням дозами 154,8–206,4 Кл/кг (600 тис.-800 тис. Р) за методикою В. Ю. Кассіча (2004, 2012, 2015) [115, 364, 365], готували за модифікованою нами методикою [369], яка включала відбір клітинного матеріалу; фіксацію мікроорганізмів; відмивку від фіксатора; хімічне зневоднення. Після контакту з кожним розчином суспензію мікроорганізмів піддавали центрифугуванню. В якості фіксатору використали глутаровий альдегід на фосфатному буфері Міллоніга, який відрізняється швидким проникненням та стабілізацією морфологічних структур в клітинах за рахунок "зшивання" білкових полімерів, що входять до складу клітинних мембран.

Сумарний час фіксації складав 1 год і 30 хв, Після кожної зміни фіксатору розчини центрифугували при 1500 об./хв. тривалістю 5 хв. та зливали надосадову рідину.

Для процедури дегідратації об'єкту дослідження використовували етиловий спирт зростаючої концентрації.

Проводку по серії етилових спиртів почали з 50%-го розчину. При цьому дотримувались співвідношення об'ємів суспензії мікроорганізмів до дегідруючого розчину 1:10. Після витримки впродовж 5 хв суспензію центрифугували. Після зливання надосадової рідини, аналогічно повторювали процедуру зневоднення з 60 %, 70 %, 80 % розчинами етилового спирту. Далі у співвідношенні 1:10 вносили 96 % етиловий спирт, витримували 15 хв. Після центрифугування у тому ж співвідношенні вносили абсолютний (100 %) спирт на 15 хв. Зневоднення абсолютним спиртом повторювали двічі. Краплинку суспензії переносили бактеріальною петлею на металічний предметний столик із закріпленою двобічною вуглецевою стрічкою. Сушку зразків проводили на повітрі. Надання зразкам електропровідності здійснювали шляхом напилення сріблом у вакуумному універсальному пості "ВУП – 5М".

Виготовлення туберкуліну. В якості основного та контрольного використовували класичний технологічний спосіб одержання туберкуліну з культурального фільтрату мікобактерій збудника туберкульозу, вирощених на рідкому синтетичному живильному середовищі шляхом стерилізації культур автоклавуванням, відокремлення бактеріальної маси, одержання й стерилізації культуральних фільтратів, осадження протеїну розчином трихлороцтової кислоти, переосадження його насиченим розчином сірчанокислового амонію, очищення від солей за допомогою діалізу з подальшим визначенням концентрації протеїну в 1 см³ розчину методом К'ельдаля.

Запропонованим нами способом протеїн з суспензії відокремлювали від рідини шляхом ультрацентрифування при 14-15 тис. об./хв. на промисловому

малооб'ємному високообертovому сепараторі або ультрацентрифузі («Сверхцентрифуга СГО-100 x75» – 15 тис. об. хв.; або «Сверхцентрифуга ОТР-17», швидкість обертів ротора 256 тис./хв.).

Визначення вмісту протеїну в 1 см³ розчину туберкуліну проводили за методом К'ельдаля. В бактеріологічну пробірку вносили 2 см³ одержаного препарату. В пробірку з 2 см³ суспензії протеїну вносили 2 см³ розчину трихлороцтової кислоти (ТХО) з масовою часткою 10% і залишали у холодильнику на 30 хвилин за температури від 4 ° до 6 °С для коагуляції білка. Потім фільтрували через знезолений фільтр, змиваючи залишки білка з пробірки розчином ТХО з масовою часткою 5%. Білок на фільтрі тричі промивали розчином ТХО з масовою часткою 5% для вилучення залишкового азоту. Фільтр з білком висушували на повітрі, потім вносили у колбу К'ельдаля, додавали 2 см³ концентрованої сірчаної кислоти й мінералізували нагріванням. Мінералізацію проводили у присутності каталізатору – перекису водню, який додавали по 0,5 см³ через кожні 15-20 хвилин до повного знебарвлення розчину.

Після охолодження вміст колби К'ельдаля переносили у колбу для відгону, залишки розчину змивали порціями дистильованої води загальним об'ємом 10-12 см³. Вичерпаність переносу перевіряли індикатором метиленовим рожевим. При цьому остання проба промивної води мала жовтий колір.

В колбу Ерленмейєра наливали 20 см³ 0,05 моль/дм³ розчину сірчаної кислоти і 10-15 крапель індикатору Ташіро. Індикатор Ташіро готували змішуванням у рівних об'ємах спиртового розчину метиленового червоного з масовою часткою 0,2% і спиртового розчину метиленового синього з масовою часткою 0,1%.

Відгінну колбу з'єднували з холодильником та пароутворювачем. Вміст колби нейтралізували розчином гідроокису натру з масовою часткою від 30 до 33 % за індикатором метиленовим рожевим. Потім вміст відганяли. Відгін аміаку проводили до тих пір, поки в приймальній колбі накопичувалось

приблизно 20 см³ розчину. Завершення відгону перевіряли лакмусовим папером.

Вміст приймальної колби титрували розчином гідроокису натру 0,1 моль/дм³ до зміни забарвлення розчину від лілового до зеленого за додаванням індикатору Ташіро. Одночасно визначали масову частку азоту в знезоленому фільтрі.

Масову частку білка в пробі досліджуваного розчину (X) в мг/см³ обчислювали за формулою (1):

$$X = \frac{(VK - V_1K_1) - (V_2K - V_3K)1.4}{2} 6.25 \quad (1)$$

де V – об'єм 0,1 моль/дм³ розчину сірчаної кислоти, що налитий у приймальну колбу при аналізі проби, см³.

K – поправочний коефіцієнт до титру 0,1 моль/дм³ розчину сірчаної кислоти;

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

K₁ – поправочний коефіцієнт до титру 0,1 моль/дм³ розчину гідроокису натрію;

V₂ – об'єм 0,1 моль/дм³ розчину сірчаної кислоти, що налитий у приймальну колбу під час аналізу знезоленого фільтру, см³;

V₃ – об'єм 0,1 моль/дм³ розчину гідроокису натрію, що витрачений на титрування при аналізі знезоленого фільтру, см³;

1,4 – маса азоту, що відповідає 1 см³ 0,1 моль/дм³ розчину сірчаної кислоти, мг.

В процесі роботи розробили засоби і способи вдосконалення класичної технології: виробничі штами *Mycobacterium bovis* Vallee КМІЕВ-9 та *Mycobacterium bovis* Vallee КМІЕВ-9КМ; живильні середовища Сотона КФ та Сотона ХБ; спосіб виготовлення препарату з використанням мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування; спосіб визначення активності туберкуліну з використанням інактивованих *Mycobacterium bovis*.

Визначення активності ППД-туберкуліну для ссавців проводили у відповідності до вимог ДСТУ 4664:2006: «Туберкулін очищений для ссавців

у стандартному розчині». Активність дослідної серії туберкуліну визначали порівнянням з контрольною серією препарату на здоровій великій рогатій худобі та морських свинках, яких попередньо сенсibilізували зависсю, інактивованої автоклавуванням культури *M. bovis (Vallee)* та мікобактерії штаму *БЦЖ*, суспендованих в стерильному вазеліновому маслі. Контрольним тваринам культури мікобактерій не вводили.

Для сенсibilізації великої рогатої худоби готували завись, що містить 5 мг інактивованої автоклавуванням (за температури 100° С впродовж трьох годин, або при 110 °С протягом однієї години) культури *M. bovis (Vallee)*, в об'ємі 5 см³ стерильного вазелінового масла або ізотонічного розчину та завись культури *БЦЖ*, що містить 5 мг бактеріальної маси в об'ємі 5 см³ ізотонічного розчину або стерильного вазелінового масла (Дослід 2).

Для сенсibilізації морських свинок готували завись, що містить 1 мг інактивованої автоклавуванням культури *M. bovis (Vallee)*, в об'ємі 1 см³ стерильного вазелінового масла або ізотонічного розчину, та завись культури *БЦЖ*, що містить 1 мг бактеріальної маси в 1 см³.

Перед проведенням випробування (за 3-5 діб) шерсть по боках морських свинок вищипували. Виготовлені розведення алергенів (1, 2, 3, 4) вводили внутрішньошкірно кожній морській свинці в депільовані ділянки шкіри в дозі 0,1 см³ по два розведення з кожної сторони тіла в умовні місця ін'єкцій: а, б, в, г. Відстань між місцями введення з кожної сторони тіла була не меншою 40 мм.

Кожне розведення туберкуліну вводили окремим шприцом, номер якого відповідає номеру розведення препарату. Шприци з набраним розчином розташовували на кришці стерилізатора за їх порядковими номерами (1, 2, 3, 4). Шкіру фіксували великим і вказівним пальцями, паралельно до її поверхні, голку вводили у шкіру свинки не менше, ніж на 3 мм. Потім шкіру відпускали і натиском на поршень повільно вводили 0,1 см³ розчину. В місці введення утворювалась випуклість величиною з горошину. Для попередження витікання розчину голку після введення розчину затримували

на 1-2 секунди у шкірі, а потім виймали.

Після ін'єкції розведення першій свинці перший шприц з цим розведенням клали у кінець рядка, за шприцом № 4. Решту шприців після введення розчинів алергенів клали на попередні місця.

Ін'єкцію розчину туберкуліну другій свинці робили шприцом № 2, який потім клали праворуч за шприцом № 1. Решту шприців після введення розчинів алергенів клали на попередні місця.

Таким чином, умовний номер кожної свинки відповідав номеру розведення, яке вводили цій свинці першим шприцом в умовне місце ін'єкції.

Кожну свинку після ін'єкції їй розведення туберкуліну мітили фарбою, що не змивається.

Активність туберкуліну (А) в Міжнародних одиницях (МО) обчислювали за формулою (2):

$$A = \frac{d_1}{d_2} \times 50000, \quad (2)$$

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.

Визначення бактеріальної, грибної та мікоплазменої контамінації препарату проводили згідно ДСТУ 4483:2005 «Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи бактеріальної і грибної контамінації» та згідно вимог Європейської фармакопеї [62]. Дослідження проводили шляхом висіву в пробірки з поживними середовищами МПА, ТГС та Сабура по 1 см³ із загальної середньої проби препарату. Про відсутність контамінації робили висновки по відсутності росту мікроорганізмів на даних живильних середовищах (відсутності помутніння, газоутворення, зміни кольору середовища ТГС, відсутності колоній на поверхні МПА, Сабура).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Адаптація, селекція, депонування та впровадження у виробництво ППД-туберкуліну для ссавців очищеного виробничих штамів *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 та *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 КМ

Для виробництва ППД-туберкуліну для ссавців використовують декілька виробничих штамів, в тому числі: штам *M. bovis Vallee* (Тихонов І. В., Рубан Е. А., Грязнева Т. Н. з співав., 2005; Говоров А. М., Осташко Ф. И., 1956; Лысенко А. П., 1994 та інші); штам *M. bovis AN5* (Колос Ю. О., Хоменко В. І., Титаренко В. Ф., Клименко О. М., 2006, Кассич В. Ю., Овдиенко Н. П., 2008, Козлов В. А, 2010, 2011 та інші); штам *M. bovis* ІЕКВМ-1 (Кассич Ю. Я. з співав., 1999); туберкуліногенний штам *M. bovis* № 4 (Завгородній А. І., Стегній Б. Т., Білушко В. В., Позмогова С. А., Дегтярьов І. М., Удовенко Я. С., 2007). В нашій роботі використовували референтний штам збудника туберкульозу бичачого виду *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 (Додатки А.1, Б).

Суттєвим недоліком перелічених вище штамів є тривалий ріст, повільне накопичення бактеріальної маси мікобактерій в процесі їх культивування на рідкому синтетичному живильному середовищі Сотона і, відповідно, низький вихід кінцевого продукту – туберкулопротеїну.

Крім того, згідно стандарту ЕС, що надає *Institute voor Die rhoude rijen Diergen zondheid (ID-DLO), Lelistad, The Netheriands*, ППД-туберкулін для ссавців повинен виготовлятися зі штамів *M. bovis* «AN5» або «Vallee», в той час як при виготовленні вітчизняного препарату: «Туберкулін очищений (ППД) для ссавців в стандартному розчині» (ТУУ 24.00497087.645-2001), основним виробничим штамом є «*M. bovis* ІЕКВМ-1». Тому розробка вітчизняного сухого очищеного ППД-туберкуліну з штаму *M. bovis* «Vallee» є актуальним завданням [148].

Наведені обставини вимагали пошуку штаму *M. bovis Vallee*, здатного до прискореного росту та високого і швидкого накопичення бактеріальної маси мікобактерій та продукції туберкулопротеїнів при культивуванні на синтетичному живильному середовищі.

Поставлене завдання вирішували шляхом того, що одержаний нами в рамках творчого обміну з РУП «ІЕВ» ім. С. Н. Вишелеського сублімований штам збудника туберкульозу бичачого виду, який згідно паспорту штаму має назву «*M. bovis Vallee* КМІЕВ-9» (Додатки А.1, Б). розконсервували та адаптували до щільних елективних живильних середовищ Павловського, Левенштейна-Ієнсена, ІЕКВМ, та рідких синтетичних живильних середовищ Сотона КФ та Сотона ХБ, які використовуються в технологічному процесі виробництва ППД-туберкуліну для ссавців на Херсонському державному підприємстві – біологічна фабрика.

З метою отримання виробничого штаму з прискореним ростом та підвищеним накопиченням бактеріальної маси мікобактерії штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 піддавали впливу гамма-опромінення за методикою В. Ю. Кассіча [114, 115, 123]. Після опромінення «стимулюючими» дозами від 0,00645 до 206,4 Кл/кг (25-250 Р) 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 Левенштейна-Ієнсена, Павловського та Сотона-ХБ. При цьому прискорення швидкості росту культур було статистично не достовірним. Змін ультраструктури мікроорганізмів під час електронномікроскопічних досліджень не спостерігали. Проте, при культивуванні штаму збудника туберкульозу бичачого виду *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 на «Живильному середовищі Сотона КФ для прискореного накопичення бактеріальної маси» впродовж 2-3 генерацій було відзначене прискорення росту мікобактерій і підвищення накопичення бактеріальної маси. Тобто середовище Сотона КФ мало стимулювальні та селективні властивості, що призвело до отримання штаму з прискореним ростом мікобактерій: культура мікобактерій починала рости

раніше (на $4,5 \pm 1,8$) діб і давала більше накопичення бактерійної маси (мікробна плівка формувалася на $(4,1 \pm 0,9)$ діб раніше), порівняно з вихідним штамом *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9.

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» (Додаток Д, Патент на корисну модель № 109231 від 25.08.2016 р.). Фактично, одержаний штам *Vallee* КМІЕВ-9КМ 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).

Електронномікроскопічне дослідження культури *M. bovis* виконували на приладі «РЭМ – 106 И» (ВАТ *Selmy*, 2007). При вивченні електронномікроскопічних препаратів з культур виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ відзначали, що мікобактерії мають вигляд коротких або помірно довгих овоїдних паличок, іноді розташованих у вигляді значних скупчень, конгломератів (Рис. 3.1). Відзначається значний поліморфізм культур, який залежить від терміну вирощування та середовища культивування. Всередині деяких клітин помітно зернистість (зерна Муха). Чисті культури першої та подальших генерацій штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ на середовищі Сотона КФ та Сотона ХБ мають такі властивості. В мазках, виготовлених з культур, вирощених на щільних та рідких синтетичних живильних середовищах: Левенштейна-Ієнсена, ІЕКВМ, сухому живильному середовищі для прискореного культивування мікобактерій (Патент Укр. № 54203 А; розробники Кассіч Ю. Я., Кассіч В. Ю. з співав.),

Сотона різних модифікацій, пофарбованих за Ціль-Нільсеном мікобактерії мають вигляд паличок, розміром 0,3- 0,6 x 1,5 мкм (до 10 мкм).

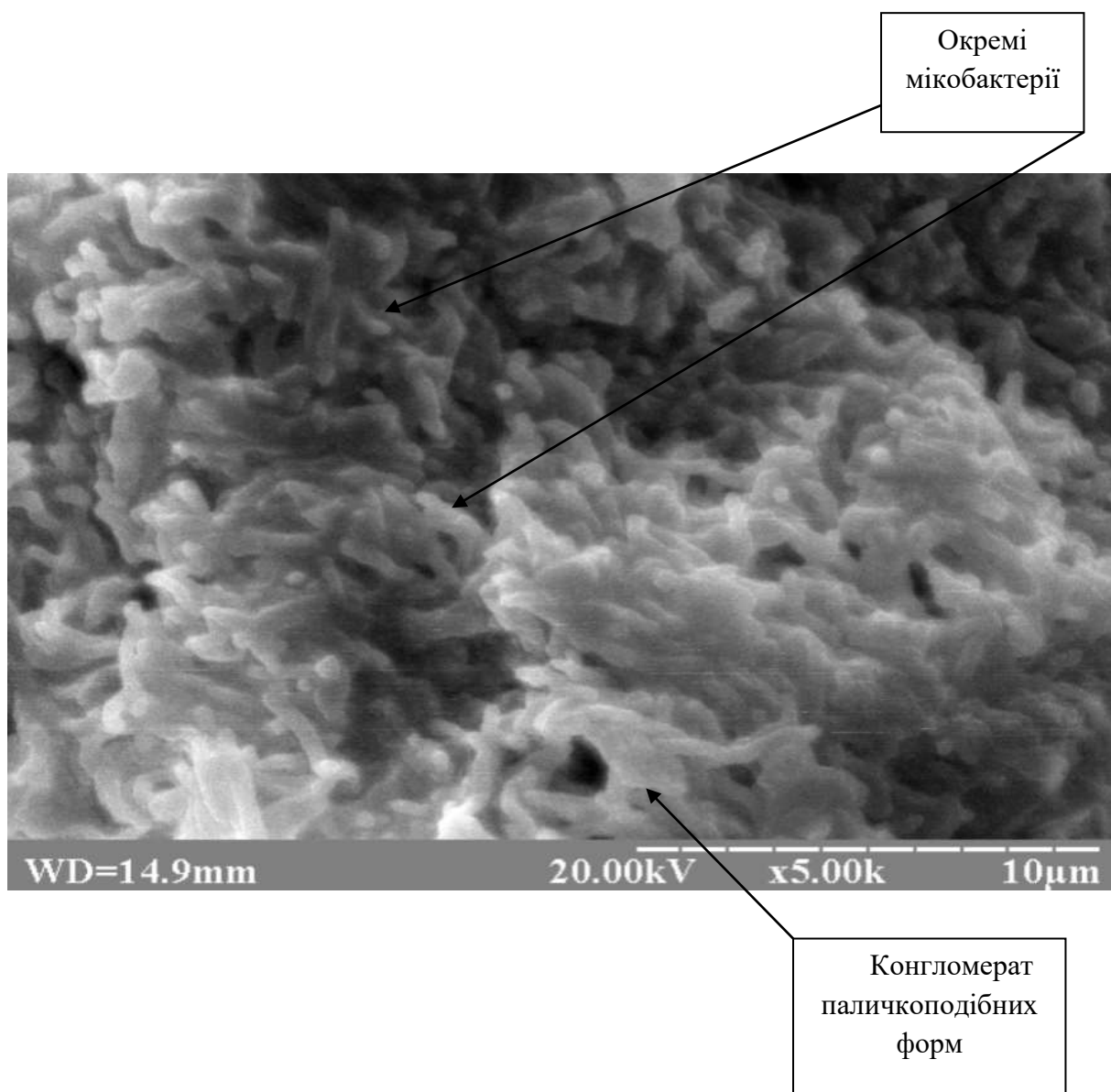


Рис. 3.1. Мікобактерії виробничого штаму *M. bovis Vallee* KMIEB-9KM з середовища Сотона ХБ. Конгломерат паличкоподібних форм. Мікрофото авторів розробки. Збільшення $5,0 \times 10^3$.

На МПА та МПБ штам не росте; росте на яєчних та картопляних живильних середовищах тільки при 37 °С. Колонії культур сухі, дрібні, кольору слонової кістки. Швидкість росту в субкультурі 10-20 діб. На поверхні рідких живильних середовищах утворює кришкувату плівку, без помутніння середовища (Рис. 3.2).

Виробничий штам *M. bovis* Valle KMIEB-9 не гідролізує Твін 80, нітроредуктазна реакція негативна. В перехресному імуноелектрофорезі з референс-сироваткою *M. bovis* № 8 утворює 12-15 преципітатів, ідентичних преципітатам антигенів *M. bovis* № 8. Дає позитивну реакцію в ПЛР з використанням праймерів 6110. Дослідження проведені на базі РУП «ІЕВ» ім. С. Н. Вишелеського (м. Мінськ) співробітниками установи під керівництвом професора П. А. Красочко, яким дисертант висловлює глибоку подяку (Додаток А.1).

Для відтворення та перевірки біологічних властивостей штамів проведено біопробу на мурчаках і кролях. Виробничі штами *M. bovis* Vallee KMIEB-9 та *M. bovis* Vallee KMIEB-9KM є помірно патогенними для лабораторних тварин. При підшкірному зараженні в дозі 1 мг на тварину у морських свинок масою 300-350 г та кролів масою 2-3 кг розвиваються ознаки туберкульозу з ураженням печінки, селезінки та легень. Тварини гинуть впродовж 90 діб після зараження з картиною генералізованого туберкульозу.

При дослідженні препаратів *M. bovis*, опромінених γ -випромінюванням (за методикою В. Ю. Кассіча, 2004) «стерилізуючими» дозами від 154,8 до 206,4 Кл/кг (600 тис. – 800 тис. Р), встановлено, що ріст та репродукція їх на поживних середовищах припиняється (настає «репродуктивна загибель»). Клітини мікобактерій при таких дозових навантаженнях гублять чіткість обрисів, набувають розмиті контури, обезбарвлену цитоплазму, деструктивну зернистість, відзначається частковий розпад оболонки. Метод радіаційної

стерилізації мікобактерій виявився ефективним і економічним в лабораторних умовах, але не технологічним – непридатним для використання в процесі виготовлення туберкуліну за відсутністю необхідного обладнання.

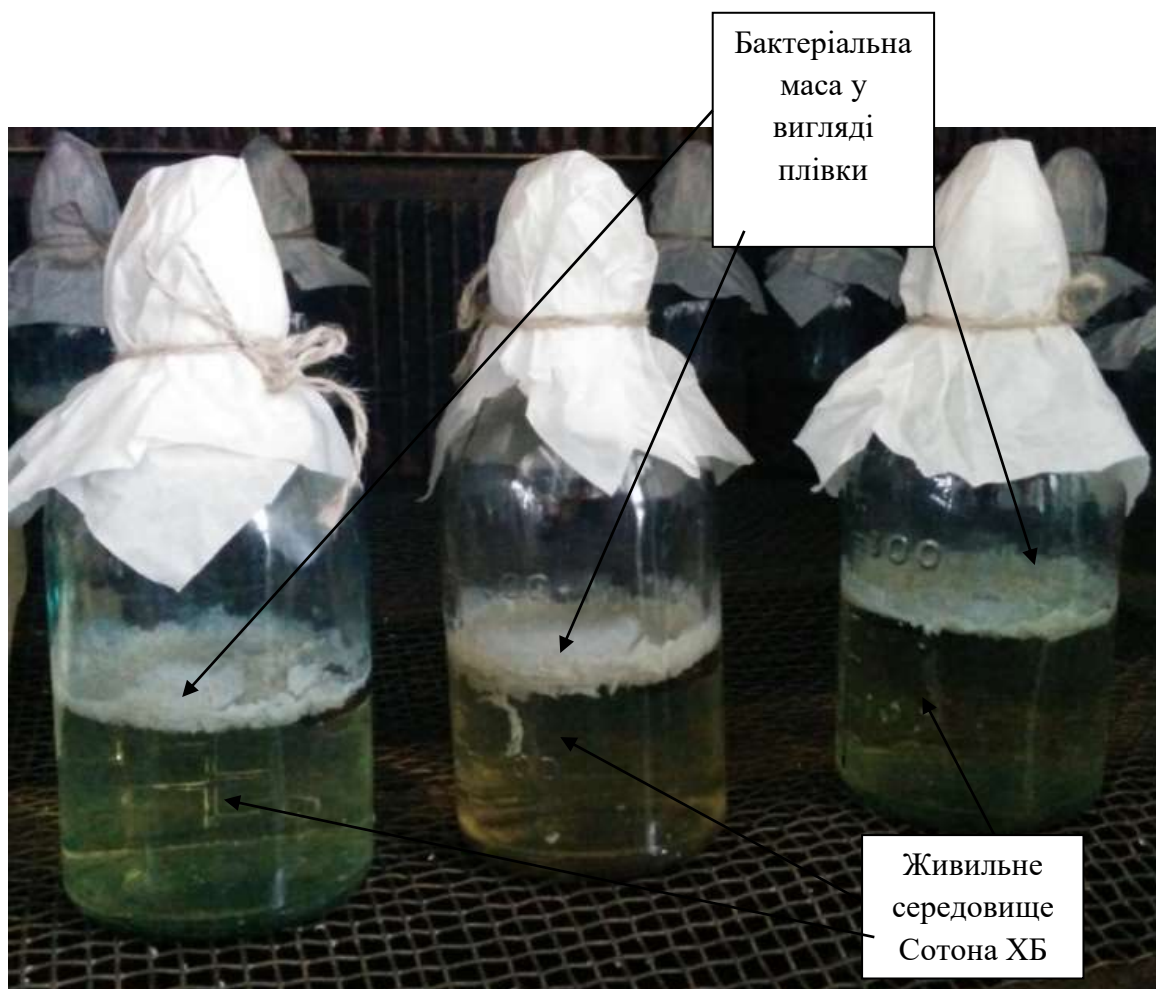


Рис. 3.2. Накопичення на середовищі Сотона-ХБ бактеріальної маси мікобактерій виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ. Фото авторів розробки.

В подальшому визначали терміни початку росту, формування плівки та ваги накопиченої бактеріальної маси. Для цього проводили культивування та накопичення бактеріальної маси мікобактерій туберкульозу штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 (Дослід 1) та досліджуваного штаму *M. bovis Vallee*

КМІЕВ-9КМ запропонованим нами методом на середовищі Сотона-ХБ (Дослід 2). Кожен дослід проводили в трьох повторностях. Результати дослідів наведені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1.

Терміни початку росту, формування плівки та ваги накопиченої бактеріальної маси виробничих штамів

Дослід 1	Дослід 2	Різниця, <i>p</i>
Штам <i>M. bovis Vallee</i> КМІЕВ-9	Штам <i>M. bovis Vallee</i> КМІЕВ-9КМ	
Термін початку росту (через-діб)		
10,0±1,0	9,0±1,0	1,0 <i>p</i> < 0,05
Термін формування плівки (через-діб)		
19,5±3,0	16,6±3,8	2,9 <i>p</i> < 0,05
Вага накопиченої бактеріальної маси (мг)		
59,5±0,3	75,6±0,6	16,1 <i>p</i> < 0,05

Дослід 1. Флакони з характерним для штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 ростом далі культивували на рідкому середовищі Сотона ХБ в термостаті при 37-38 °С до формування на поверхні середовища крихкуватої плівки з бактеріальної маси мікобактерій. При цьому появу первинного росту спостерігали через (10,0±1,0) діб. Появу суцільного росту у вигляді плівки на поверхні середовища Сотона спостерігали через (19,5±3,0) діб. Після закінчення культивування мікобактерій флакони з культурами піддавали автоклавуванню при 1,5 атм. впродовж 20 хвилин.

Відділення бактеріальної маси мікобактерій від культуральної рідини проводили в умовах боксу центрифугуванням впродовж 20 хвилин при 3 тис.

об/хв Одержану бактеріальну масу відмивали стерильною дистильованою водою (рН 7,0-7,1), просушували на паперовому фільтрі та зважували на електрогнних терезах. Вага бактеріальної маси становила $(59,5 \pm 0,3)$ мг.

Дослід 2. Флакони з характерним для штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ ростом культивували на середовищі Сотона ХБ в термостаті при 37-38 °С до формування на поверхні середовища щільної крихкуватої плівки з бактеріальної маси мікобактерій. При цьому появу первинного росту спостерігали через $(9,0 \pm 1,0)$ діб. Появу суцільного росту у вигляді плівки на поверхні рідкого середовища спостерігали через $(16,6 \pm 3,8)$ діб.

Відділення бактеріальної маси мікобактерій від культуральної рідини проводили центрифугуванням впродовж 20 хвилин при 3 тис.об/хв. Одержану бактеріальну масу відмивали стерильною дистильованою водою (рН 7,0-7,1), просушували на паперовому фільтрі та зважували. Вага бактеріальної маси *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ становила $(75,6 \pm 0,5)$ мг.

Тобто, в досліді 2, з використанням запропонованого нами штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ ріст та формування плівки мікобактерій у флаконі з середовищем починався раніше на 2,5 доби, а вихід бактеріальної маси з одного флакону був вищим на 16,1 мг.

Наступним етапом роботи було визначення масової концентрації білка в пробах туберкуліну, виготовленого з штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 (Дослід 3) та штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ (Дослід 4) .

Для цього з культурального фільтрату штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 (Дослід 3) та штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ (Дослід 4) виготовили дослідні серії туберкулінів (ППД) для ссавців у стандартному розчині. Культури мікобактерій вирощували на рідкому синтетичному живильному середовищі Сотона ХБ для прискореного накопичення бактеріальної маси мікобактерій. Результати проведених досліджень наведені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2.

**Масова частка білка в пробах туберкуліну з виробничих штамів
M. bovis Vallee КМІЕВ-9 та КМІЕВ-9КМ**

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

Препарат одержували шляхом стерилізації культур автоклавуванням (100 °С, 3 години), відокремлення бактеріальної маси шляхом фільтрації через полотняні фільтри, 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 в 1 см³ розчину.

Масову концентрацію білка в мг/см³ (X) в одержаних пробах туберкуліну, виготовленого з виробничих штамів *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 (Дослід 3) та *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ (Дослід 4) визначали та обчислювали за методом К'ельдаля.

Згідно вимог ДСТУ 4664:2006: «Туберкулін очищений для ссавців у стандартному розчині» масова частка білка у туберкуліні повинна складати $(0,8 \pm 0,2)$ мг/см³.

Масову частку білка в одержаних препаратах (дослід 3 та Дослід 4) визначали за формулою:

$$X = \frac{(VK - V_1K_1) - (V_2K - V_3K)1.4}{2} 6.25, \quad (1)$$

де V – об'єм 0,1 моль/дм³ розчину сірчаної кислоти, що налитий у приймальну колбу при аналізі проби, см³.

K – поправочний коефіцієнт до титру 0,1 моль/дм³ розчину сірчаної кислоти;

V_1 – об'єм 0,1 моль/дм³ розчину гідроокису натрію, що витрачений на титрування проби, см³;

K_1 – поправочний коефіцієнт до титру 0,1 моль/дм³ розчину гідроокису натрію;

V_2 – об'єм 0,1 моль/дм³ розчину сірчаної кислоти, що налитий у приймальну колбу під час аналізу знезоленого фільтру, см³;

V_3 – об'єм 0,1 моль/дм³ розчину гідроокису натрію, що витрачений на титрування при аналізі знезоленого фільтру, см³;

1,4 – маса азоту, що відповідає 1 см³ 0,1 моль/дм³ розчину сірчаної кислоти, мг.

Масова частка білка в пробі туберкуліну, виготовленого з штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ була достовірно більшою ($P < 0,05$) і становила $(1,20 \pm 0,2)$ мг/см³, в той час, як в пробі туберкуліну з штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 масова частка білка становила $(0,89 \pm 0,1)$ мг/см³.

Результати проведених досліджень свідчать, що штам *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ здатний до продукції туберкулопротеїну на високому рівні: $(1,20 \pm 0,2)$ мг/см³, а тому являється перспективним при виробництві ППД-туберкуліну для ссавців. При цьому масова частки білка у пробі туберкуліну з штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 — $(0,89 \pm 0,1)$ мг/см³ хоча й нижча, проте також дозволяє використовувати штам в якості виробничого, або резервного при виготовленні ППД-туберкуліну для ссавців.

Таким чином, запропонований виробничий штам мікобактерій *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ при культивуванні на синтетичному

живильному середовищі Сотона ХБ дозволяє прискорити ріст і підвищити накопичення бактерійної маси мікобактерій з одного флакону з $(59,5 \pm 0,3)$ мг до $(75,6 \pm 0,6)$ мг — на $(16,1)$ мг і дає можливість відповідно збільшити вихід туберкулопротеїну (діючої речовини препарату) до $(1,20 \pm 0,2)$ мг/см³.

Результати досліджень використані при проведенні депонування виробничих штамів в Депозитарії ДНКІБШМ. Одержані свідоцтва про депонування виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 за № 538 та виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ за № 539.

3.2 Розробка живильних середовищ для промислового культивування мікобактерій виробничих штамів *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 та *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ

3.2.1 Синтетичне живильне середовище Сотона КФ для прискореного росту мікобактерій при виготовленні туберкуліну.

Різними дослідниками розроблена велика кількість синтетичних живильних середовищ для культивування мікобактерій, зокрема середовища Мідлбрук, Моделя, Сотона, «Синтетичне живильне середовище для культивування туберкуліногенних штамів мікобактерій» (Патент України № 55922 А від 15.04.2003 р., розробники: Кассіч Ю. Я. з співав.), середовище Сотона за класичним медичним прописом, середовище Сотона за прописом Курської біологічної фабрики, середовище Сотона *HIMEDIA* (Індія), тощо.

Під час виконання підготовчих робіт нами було розроблене «Синтетичне живильне середовище Сотона КФ для прискореного накопичення бактеріальної маси мікобактерій» (Додаток 3: Патент України на корисну модель № 63246 U, МПК C12N 1/20, C 12R 1/32 від 10.10.2011 р.). Поставлене завдання вирішували шляхом заміни у складі середовища Сотона за класичним медичним прописом заліза лимоннокислого аміачного двухвалентного (зеленого) або трьохвалентного (коричньового) на залізо сірчанокисле ($FeSO_4$) та додавання амонію лимоннокислого двохзаміщеного

($C_6H_{14}O_7N_2$), цинку сірчаноокислого ($ZnSO_4$) та вітаміну B_1 і вітаміну B_{12} , при співвідношенні компонентів, що наведено у таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

**Склад та співвідношення компонентів живильного середовища
Сотона КФ для прискореного культивування мікобактерій**

Склад компонентів	Співвідношення компонентів середовища Сотона КФ (мас. %)
L-аспарагин ($C_4H_3NO_3 \cdot H_2O$)	3,0
Калій фосфорнокислий двозаміщений (K_2HPO_4)	0,3
Магній сірчаноокислий ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$)	0,3
Лимоннакислота ($C_6H_5O_7 \cdot H_2O$)	0,5
Залізо сірчаноокисле ($FeSO_4$)	0,01
Цинк сірчаноокислий ($ZnSO_4$)	0,05
Амоній лимоннокислий двохзаміщений ($C_6H_{14}O_7N_2$)	0,5
Гліцерин ($C_3H_8O_3$)	30,0
Вода дистильована підогріта до температури 70 С.	до 1 л
вітамін B_1 – мг на 1 л. середовища	0,025
вітамін B_{12} – мг на 1 л. середовища	0,025
$pH - 7,0 \pm 0,2$ (доводили 10 % розчином аміаку)	

Терміни росту та вихід бакмаси виробничого штаму *M. bovis* Vallee КМІЕВ-9 на середовищі Сотона КФ наведені в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

**Терміни росту та вихід бактеріальної маси виробничого штаму
M. bovis Vallee КМІЕВ-9 на середовищі Сотона КФ та на середовищі
 Сотона за класичним прописом**

Показники	Середовище Сотона КФ	Середовище Сотона за класичним прописом	Різниця, <i>p</i>
Поява первинного росту, дні	9,0±0,1	12,0±0,3	3,0 <i>p</i> < 0,05
Поява суцільного росту у вигляді плівки на поверхні середовища, дні	18,0±0,2	24,0±0,2	6,0 <i>p</i> < 0,05
Вихід бактеріальної маси на середовищі, мг.	55,0±0,1	48,0±0,4	7,0 <i>p</i> < 0,05

Матеріали таблиці 3.4 свідчать про те, що 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 діб раніше. Вихід бактеріальної маси був на 7,0 мг більшим. Основні наукові результати розділу опубліковані в працях автора [361-378], Додаток А.

3.2.2 Синтетичне живильне середовище Сотона ХБ для виробничого культивування мікобактерій в процесі виготовленні ППД туберкуліну.

Для виробничого культивування мікобактерій в умовах Херсонського державного підприємства – біологічна фабрика розроблене живильне середовище Сотона ХБ (Додаток Ж). В основу роботи була поставлене завдання розробити ефективне, економічне і зручне у виготовленні та

використанні синтетичне живильне середовище для культивування мікобактерій, склад якого дозволить прискорити ріст і накопичення бактеріальної маси та підвищити вихід протеїну мікобактерій з одиниці об'єму середовища в процесі виготовлення очищеного (ППД) туберкуліну.

Поставлене завдання вирішували шляхом додавання до складу комерційного середовища Сотона, що виготовляє Індійська фірма *HIMEDIA* в якості ростового фактору вітаміну B_1 та вітаміну B_{12} , при співвідношенні компонентів, що наведено у таблиці 3.5.

Таблиця 3.5.

**Склад та співвідношення компонентів живильних середовищ
HIMEDIA та
Сотона ХБ для прискореного культивування мікобактерій**

Інгредієнти	Кількість (грам/літр)		
	середовище Сотона <i>HIMEDIA</i>	середовище Сотона ХБ	
		Варіант 1	Варіант 2
Заліза амонійного цитрат	0,0167	0,0167	0,0167
L-Аспарагін ($C_4H_3NO_3 \cdot H_2O$)	1,330	1,330	1,330
Лимонна кислота ($C_6H_5O_7H_2O$)	0,660	0,660	0,660
Магнія сульфат ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$)	0,166	0,166	0,166
Калія гідрофосфат (K_2HPO_4)	0,287	0,287	0,287
Натрія дігідрофосфат	0,633	0,633	0,633
Натрія хлорид ($NaCl$)	0,400	0,400	0,400
Твин-80	0,833	0,833	0,833
вітамін B_1	-	0,025	0,05
вітамін B_{12}	-	0,025	0,05
Кінцеве значення pH (при 25°C) $7,2 \pm 0,2$			

Дослідне живильне середовище готували таким чином. Наважки солей розчиняли у дистильованій воді у наведеній в таблиці 3.5 послідовності, фільтрували, розливали у флакони по 200 мл. Стерилізували автоклавуванням при 110 °C 10 хв. Після стерилізації додавали 25% розчин водного аміаку до $pH 7,2 \pm 0,2$.

Лимонну кислоту, вітамін B_1 , вітамін B_{12} та гліцерин, стерильно додавали після автоклавування.

Середовище Сотона *HIMEDIA* готували таким чином. Розмішували 4,32 г порошку в 1000 мл дистильованої води, що містила 20 мл гліцерину. Кип'ятили для повного розчинення часток. Стерилізували автоклавуванням при 1,1 атм. (121°C) впродовж 15 хвилин.

Випробовували два варіанти дослідного середовища з різними співвідношенні компонентів, наведеними у таблиці 3.5. Ростові властивості середовища визначали шляхом висіву на нього збудника туберкульозу бичачого виду *M. bovis Vallee* KMIEB-9KM.

Флакони з характерним для даного виду мікобактерій ростом мікобактерій культивували в термостаті при $(37,5 \pm 0,5)$ °C. Коли плівка мікобактерій покривала всю поверхню середовища культивування припиняли і одержаний продукт використовували для виготовлення ППД-туберкуліну. Після закінчення терміну культивування мікобактерій флакони з культурами піддавали автоклавуванню при 1,5 атм. впродовж 20 хвилин.

Відділення бактеріальної маси мікобактерій від культуральної рідини проводили в умовах боксу центрифугуванням впродовж 20 хвилин при 3 тис.об./хвил. Одержану бактеріальну масу відмивали стерильною дистильованою водою ($pH\ 7,0 \pm 0,2$), просушували на паперовому фільтрі та зважували.

Висіви мікобактерій на досліджувані середовища Сотона ХБ та середовище Сотона *HIMEDIA* проводили у трьох повторностях. Результати проведених досліджень наведені у таблиці 3.6.

Накопичення бактеріальної маси на середовищі Сотона ХБ було більшим. Вага бакмаси, одержаної з середовища Сотона ХБ складала $(63,5 \pm 0,2)$ мг (Варіант 1) та $(59,6 \pm 0,1)$ мг (Варіант 2), в той час як на середовищі Сотона *HIMEDIA* вона складала $(55,6 \pm 0,2)$ мг ($p < 0,05$).

Таким чином, наведений склад компонентів синтетичного живильного середовища Сотона ХБ (Варіант 1 та Варіант 2) дозволяє підвищити його

ростові якості за рахунок прискорення росту культур збудника туберкульозу й накопичення бактерійної маси мікобактерій. При цьому кращі результати одержані при використанні середовища Сотона ХБ, варіант 1.

Таблиця 3.6.

**Терміни початку первинного та появи суцільного росту
і вихід бакмаси виробничого штаму на середовищі Сотона ХБ та
*HIMEDIA***

Показники	Середовище Сотона ХБ		Середо- вище Сотона <i>HIMEDIA</i>	Різниця, <i>p</i>	
	Варіант 1	Варіант 2		B.1	B.2
Поява первинного росту <i>M. bovis Vallee</i> КМІЕВ - 9КМ, дні (<i>M ± m</i>)	8,0±0,1	10,0±0,5	11,0±0,3	3,0	2,0
				p < 0,05	
Поява суцільного росту <i>M. bovis Vallee</i> КМІЕВ- 9КМ у вигляді плівки на поверхні середовища, дні (<i>M ± m</i>)	15,0±0,9	18,0±0,1	21,0±0,7	6,0	3,0
				p < 0,05	
Вихід бактеріальної маси <i>M. bovis Vallee</i> КМІЕВ- 9КМ на середовищі, мг (<i>M ± m</i>)	63,5±0,2	59,6±0,1	Р 55,6±0,2	3,9	7,9
				p < 0,05	

Застосування в процесі виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців синтетичного живильного середовище Сотона ХБ, розробленого на базі середовища Сотона *HIMEDIA* з додаванням вітамінів B_1 та B_{12} (варіант

складу 2) забезпечує прискорення росту культур збудника туберкульозу на 3,0 доби і накопичення бактерійної маси мікобактерій до $(63,5 \pm 0,2)$ мг, що підвищує вихід кінцевого продукту (туберкуліну) з одиниці об'єму середовища.

В подальшому середовище Сотона ХБ використовували як основне виробниче середовище для культивування виробничого штаму *M. bovis Vallee* KMIEB-9KM під час виготовлення експериментальних серій ППД-туберкуліну для ссавців очищеного.

Основні наукові результати розділу опубліковані в працях автора [361-378], Додаток А.

3.3 Оптимізація технологічних методів виготовлення ППД-туберкуліну

3.3.1 Розробка способу виготовлення ППД-туберкуліну з використанням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування

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 Derivatv – PPD*) з культурального фільтрату мікобактерій, культивованих на синтетичному живильному середовищі, методом осадження трихлороцтовою кислотою (ТХО) та (або) сірчаноокислим амонієм лишається незмінним з часу розробки технології виробництва ППД-туберкуліну *F. B. Seibert* (1934, 1949). У подальшому цей метод удосконалювали М. А. Ліннікова (1959), О. М. Говоров та Ф. І. Осташко (1952, 1956), А. М. Шаров, В. М. Безгин, Н. С. Шевирев, О. О. Конарев., Ю. Я. Кассіч, А. І. Завгородній, В. Ю. Кассіч, В. В. Білушко (1987, 1991, 2002, 2004, 2006, 2011) та інші дослідники. Згаданими авторами розроблено і впроваджено у виробництво з різними модифікаціями класичний спосіб одержання туберкулопротеїнів мікобактерій з культурального фільтрату збудника туберкульозу, вирощених

на рідкому синтетичному живильному середовищі шляхом стерилізації культур автоклавуванням, відокремлення бактеріальної маси, одержання й стерилізації культуральних фільтратів (стерилізуюча фільтрація), осадження протеїну розчином трихлороцтової кислоти, переосадження його насиченим розчином сірчаноокислого амонію, очищення від солей за допомогою діалізу з подальшим визначенням концентрації протеїну в 1 см³ розчину (Рис 3.3).

Суттєвим недоліком цього 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 білку.

Для уникнення названих недоліків розроблений спосіб одержання туберкуліну з використанням ультрафільтраційних мембран (Козлов В. Е. з співавторами, 1987).

В основу нашої роботи була поставлена задача розробити спосіб одержання ППД-туберкуліну шляхом вдосконалення технологічного процесу з використанням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування, що призведе до підвищення виходу високоспецифічного та якісного кінцевого продукту.

Моношарові фільтри *Sartoclean*[®] *CA* з діаметром пор 0,45-0,2 мкм (NBSP) забезпечують найвищий вихід протеїну при утримуючій мікробній фільтрації. Мембрани з ацетату целюлози в фільтрах *Sartoclean*[®] *CA* є мембранним матеріалом з найнижчою неспецифічною зв'язувальною здатністю, що забезпечує найбільший вихід протеїну і, тим самим, підвищує ефективність технології. Завдяки «вбудованій системі попередньої фільтрації», необхідній для забезпечення економічності компоновки системи, фільтри *Sartoclean*[®] *CA* з гетерогенним подвійним шаром забезпечують найвищі показники загальної пропускної здатності (Інструкція з експлуатації).

Нами розроблений спосіб виготовлення туберкуліну із застосуванням ультрафільтраційних мембран с *НОММ* 150-1000 кДа. та запропонована обробка культуральної рідини після відділення бактеріальної маси методом мікрофільтрації з використанням капсул *Sartoclean*[®] *CA* з діаметром пор 0,2-0,45 мкм *NBSP* 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.

Поставлене завдання вирішували шляхом того, що туберкулін з культуральної рідини після накопичення та інактивації виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ на синтетичному живильному середовищі отримували таким чином:

Стерильну культуральну рідину піддавали мікрофільтрації з використанням капсул *Sartoclean*[®] *CA* з діаметром пор 0,2 мкм .

В одержаному пермеаті проводили осадження білку додаванням трихлороцтової кислоти (ТХО) до кінцевої концентрації 5%. Протеїн з суспензії відокремлювали від рідини шляхом ультрацентрифугування при 14 – 15 тис. об/хв на промисловому малооб'ємному високообертовому сепараторі (Рис. 3.3; Рис. 3.4.) або ультрацентрифузі («Сверхцентрифуга СГО-100 х 75» – 15 тис.об.хв.; або «Сверхцентрифуга ОТР-17», швидкість обертів ротора 256 тис./хв.). При цьому вихід туберкулопротеїну підвищувався у 1,5 рази (Табл. 3.7). З його осаду робили суспензію на ізотонічному розчині в співвідношенні 1:5 і проводили переосадження туберкуліну з суспензії насиченим розчином сірчаноокислого амонію та відокремлювали осад від рідини центрифугуванням за 4-6 тис. об/хв та готували суспензію на ізотонічному розчині в співвідношенні 1:5. В суспензії визначали концентрації протеїну в 1 см³ за методом К'ельдаля. Після подальшого діалізу та стерилізуючої мікрофільтрації з використанням капсул *Sartoclean*[®] *CA* з діаметром пор 0,2 мкм одержаний туберкулопротеїн використовували для виготовлення ППД- туберкуліну для ссавців очищеного (Рис 3.4).

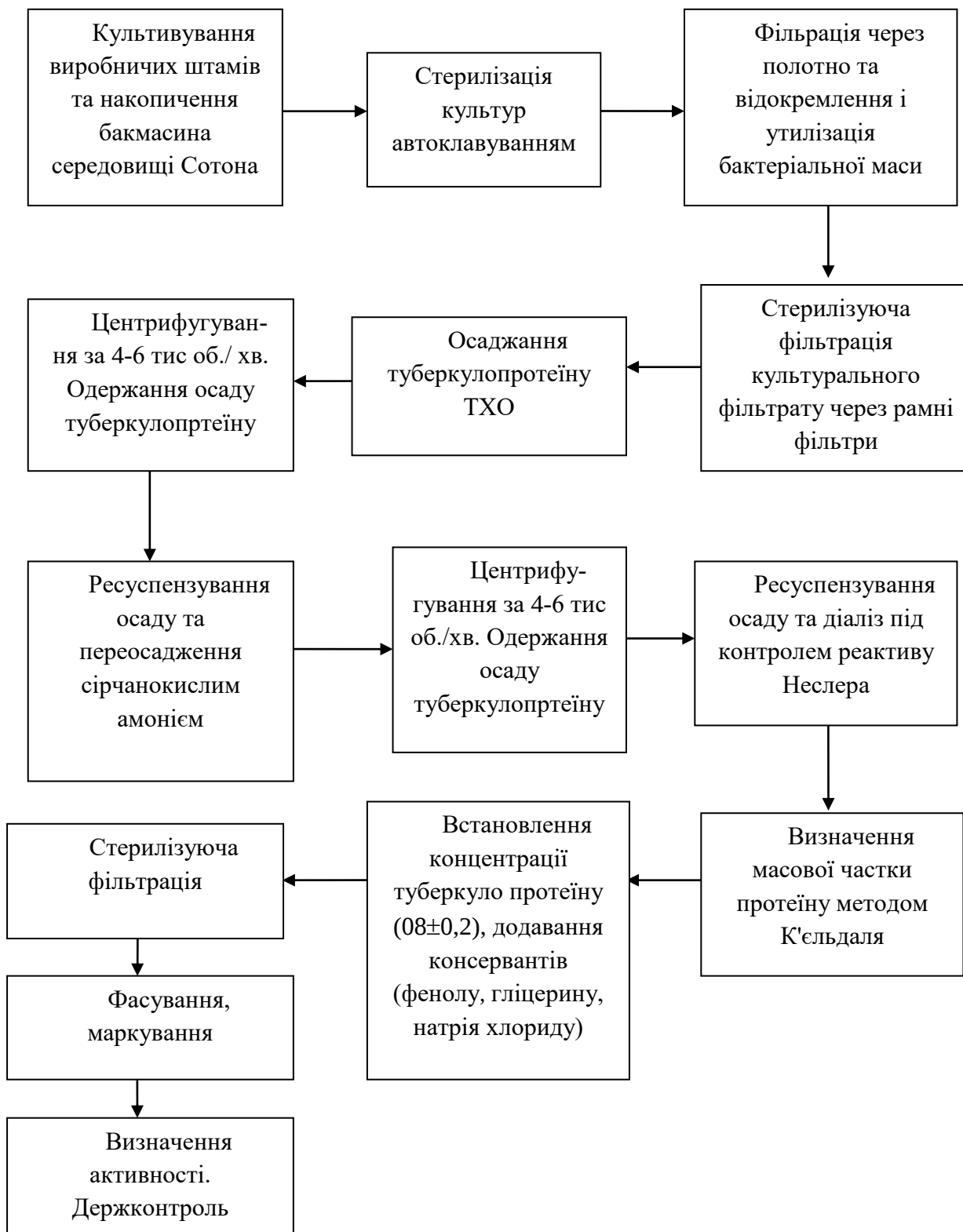


Рис. 3.3. Класична технологічна схема одержання ППД-туберкуліну.



Рис. 3.4. Вдосконалена нами технологічна схема одержання ППД-туберкуліну для ссавців очищеного. Позначкою «+» помічені модифіковані нами технологічні операції.

При цьому, за рахунок використання для первинної та стерилізуючої фільтрації капсул *Sartoclean*[®] *CA* з діаметром пор 0,45 мкм *NBSP* та 0,2 мкм *NBSP*, а також відокремлення туберкулопротейну від рідини методом ультрацентрифугування за 14 тис. об/хв, вихід туберкуліну збільшився у 1,5 рази. Масова частка білка збільшилась з $(0,8 \pm 0,2)$ до $(1,4 \pm 0,2)$ мг/см³ (Табл. 3.7).

Таблиця 3.7.

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

Характеристика досліджу	Вихід туберкулопротейну після осадження ТХО, г	Вихід туберкулопротейну 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

Першим етапом роботи з виготовлення експериментальних серій ППД-туберкуліну для ссавців очищеного № 1 (Е) та № 2 (Е) було культивування та накопичення бактеріальної маси мікобактерій. Флакони з характерним для даного виду мікобактерій ростом культивували на середовищі Сотона

модифікацій КФ або ХБ впродовж 6-8 тижнів в термостаті за 37-38 °С до формування на поверхні середовища щільної плівки з бактеріальної маси мікобактерій. При цьому появу первинного росту *M. bovis* Vallee KMIEB-9KM спостерігали через 8-11 діб ($9,1 \pm 1,1$). Появу суцільного росту *M. bovis* у вигляді плівки на поверхні середовища Сотона спостерігали через 12-21 ($17,3 \pm 3,8$) добу.

Після закінчення культивування мікобактерій флакони з культурами піддавали автоклавуванню при 1,5 атм. впродовж 20 хвилин.

Відділення бактеріальної маси мікобактерій від культуральної рідини проводили в умовах боксу шляхом фільтрації через тканинні фільтри. Одержану бактеріальну масу використовували для сенсibilізації дослідних тварин (ВРХ та мурчаків) під час визначення активності дослідно-виробничих (експериментальних) серій № 1 (Е) та № 2 (Е) «ППД-туберкуліну для ссавців очищеного», а залишок утилізували.

Туберкулін з культурального фільтрату мікобактерій отримували двома способами: класичним способом (дослід 1) та із застосуванням методу мембранної мікрофільтрації з використанням капсул Sartoclean® CA з діаметром пор 0,45 мкм і 0,2 мкм NBSP та ультрацентрифугуванням за 14 тис. об/хв (дослід 2). Досліди проводили в трьох повторностях.

Дослід 1. Виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців очищеного класичним способом (Рис. 3. 3). Одержаний фільтрат культуральної рідини переливали в циліндричний посуд об'ємом 1-2 л. і для осадження водорозчинних фракцій протеїну додавали насичений розчин ТХО кислоти до кінцевої концентрації 4 %.

Для повного осадження протеїнів циліндричні судини ставили в холодильник на 12-18 годин за температури 4-6 °С. Верхній шар рідини видаляли сифоном, а нижній центрифугували за 4-6 тис. обертів на хвилину впродовж 25-30 хвилин. При цьому маса осаду становила ($19,8 \pm 0,2$) г.

Одержаний осад ресуспензували ізотонічним розчином у співвідношенні 1:5, нейтралізували 10 % нашатирним спиртом до реакції *pH* 7,2-7,4 і зливали

у окрему ємність, після чого доводили до pH 6,0-6,8, змішували з рівним об'ємом насиченого розчину сірчанокислового амонію $(NH_4)_2SO_4$ і відстоювали 8-12 годин для переосадження протеїну.

Після відстоювання надосадову рідину утилізували, а осад протеїнів центрифугували за 4000-6000 обертів на хвилину впродовж 25-30 хвилин. Осад, що утворився, суспендували у дистильованій воді у співвідношенні 1:5 і нейтралізували нашатирним спиртом до pH 7,2.

Одержаний розчин протеїну заливали у сосисочну целофанову оболонку й піддавали діалізу у демінералізованій воді за температури від 4 ° до 6 °С до повного зникнення залишку солі фосфату сірчанокислового амонію, який визначали за допомогою реактиву Неслера. Далі розчин стерилізували через фільтр з азбестових пластин і зберігали при температурі від 4° до 6 °С. Методом К'ельдаля визначали вміст протеїну в 1 см³ розчину.

Масова частка білка в препараті, одержаному класичним способом становила $(0,8 \pm 0,2)$ мг/см³. Вихід протеїну з 1 літру середовища становив $(1,43 \pm 0,25)$ мг (Табл. 3.7).

Дослід 2. Виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців очищеного з використанням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування.

Після стерилізації культур проводили відокремлення бактеріальної маси мікобактерій від культуральної рідини шляхом фільтрації через тканинні фільтри.

Одержаний фільтрат піддавали мікрофільтрації через стандартний фільтровальний блок з капсулами *Sartoclean*[®] *CA* з діаметром пор 0,45 мкм NBSP (Рис. 3.4). Фільтрат переливали в циліндричний посуд об'ємом 1-2 л. і для осадження водорозчинних фракцій протеїну додавали 50 % розчин ТХО кислоти до кінцевої концентрації 4 %. Для повного осадження протеїнів циліндричні судини ставили в холодильник на 12-18 годин за температури 4-6 °С. Верхній шар рідини видаляли сифоном, а нижній піддавали ультрацентрифугуванню за 14 тис. об/хв за допомогою промислового високообертового сепаратора малого об'єму (Рис. 3.4, Табл. 3.7.). Як свідчать матеріали таблиці 3.7 маса

осаду після ультрацентрифугування становила $(28,4 \pm 0,3)$ г (вірогідно ($p < 0,05$) більше порівняно з класичним способом).

Одержаний осад ресуспензували ізотонічним розчином у співвідношенні 1:5, нейтралізували 10 % нашатирним спиртом до реакції pH 7,2-7,4 і зливали у окрему ємність, після чого доводили до pH 6,0-6,8, змішували з рівним об'ємом насиченого розчину сірчаноокислого амонію і відстоювали 8-12 годин (для переосадження протеїну).

Після відстоювання надосадову рідину утилізували, а осад протеїнів центрифугували за 4000-8000 обертів хвилину 25-30 хвилин. Осад, що утворився суспендували у дистильованій воді в співвідношенні 1:5 і нейтралізували нашатирним спиртом до pH 7,2.

Одержану суспензію протеїну заливали у сосисочну целофанову оболонку й піддавали діалізу у демінералізованій воді за температури від 4 до 6 °C до повного зникнення залишку солі фосфату сірчаноокислого амонію, який визначали за допомогою реактиву Неслера.

Далі суспензію піддавали стерилізуючій мікрофільтрації через блок фільтрів з використанням капсул *Sartoclean*® CA з діаметром пор 0,2 мкм і зберігали за температури від 4 ° до 6 °C.

В препаратах, виготовлених за різними технологіями (Дослід 1 та Дослід 2) визначали такі показники: вихід протеїну після осадження ТХО, вихід туберкуліну з 1 л середовища; вміст протеїну у 1 см³ суспензії за методом К'ельдаля. Результати роботи наведені в таблиці 3.7.

З матеріалів таблиці 3.7 видно, що у препараті, виготовленому за класичною технологією (Дослід 1) вихід протеїну після осадження ТХО становив $(19,8 \pm 0,2)$ г. Вихід туберкуліну з 1 л середовища становив $(1,4 \pm 0,3)$ г. Вміст протеїну у 1 см³ суспензії становив $(0,8 \pm 0,2)$ мг/см³.

В препараті, виготовленому з застосуванням методів мікрофільтрації та ультрацентрифугування (Дослід 2) вихід протеїну після осадження ТХО становив $(28,4 \pm 0,3)$ г. Вихід туберкуліну з 1 л середовища становив $(2,1 \pm 0,4)$ г. Вміст протеїну у 1 см³ суспензії становив $(1,4 \pm 0,2)$ мг/см³.

Таким чином, матеріали таблиці 3.7 свідчать, що при виготовленні туберкуліну за класичною технологією усі показники достовірно нижчі ($p < 0,05$), ніж аналогічні показники при виготовленні туберкуліну за розробленою нами технологією з виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ з використанням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування.

При використанні для виготовлення туберкуліну технології з застосуванням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування в препараті достовірно збільшуються ($p < 0,05$) вихід протеїну після осадження ТХУ на $(8,6 \pm 0,5)$ г, вихід туберкуліну з одного літру середовища на $(0,7 \pm 0,1)$ г та масова частка білка на $(0,6 \pm 0,1)$ мг/см³.

Після мікрофільтрації на ультрафільтраційних мембранних фільтрах *Sartoclean*[®] *CA* з діаметром пор 0,45-0,2 мкм (NBSP) та *HOMM* 150-1000 кДа препарат містить білкові фракції мікобактерій з молекулярною масою 150-1000 кДа, що мають найвищі показники діагностичної активності та специфічності.

За рахунок використання ультрафільтраційних мембран с *HOMM* 150-1000 кДа. та капсул *Sartoclean*[®] *CA* з діаметром пор 0,45-0,2 мкм NBSP препарат виходить гарантовано 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 білка.

Комплексний метод отримання туберкулопротеїну з культуральної рідини і бактеріальної маси. Під час розробки технології виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців очищеного нами запропоновано комплексний метод отримання туберкулопротеїну одночасно з культуральної рідини і бактеріальної маси виробничого штаму (Додаток К). При цьому, розчини туберкулопротеїну, одержані із культурального фільтрату та бактеріальної маси, озвученої ультразвуком на ультразвуковому диспергаторі УЗДН-Т при частоті ультразвуку 22кГц та інтенсивності 90, 100, 110 Вт/ см² при

трьохразовій обробці з інтервалами 3 хвилини змішували у співвідношенні 1:10, доводили рН до $(7,0 \pm 0,2)$ й на 2 доби ставили на діаліз в целофанових оболонках під контролем реактиву Неслера. Методом К'ельдаля визначали вміст протеїну в 1 см^3 розчину. Результати дослідів свідчать, що достовірно вищим ($p < 0,05$) вихід протеїну на 1 л середовища був при використанні комплексного методу отримання з культурального фільтрату та бактеріальної маси і становив $(1100,0 \pm 7,2)$ мг, в той час як вихід туберкулопротеїну з культурального фільтрату та з бактеріальної маси становив $(91,0 \pm 4,2)$ та $(130,0 \pm 3,2)$ мг, відповідно. Проте, зазначений спосіб не використовували під час виготовлення експериментальних серій препарату та складання технологічного регламенту як занадто працемісткий та за відсутності промислового обладнання.

Дезінфекція виробничих приміщень. Для дезінфекції виробничих приміщень, в яких проводились роботи з живим патогенним збудником туберкульозу бичачого виду штамів *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 та *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ («брудної зони»), застосовували препарат «Бровадез-плюс», ефективність якого доведена нами в дослідях, проведених на тест-об'єктах та в неблагополучних щодо туберкульозу ВРХ господарствах. Засіб являє собою сукупність синергічних композицій, що містять четвертинні амонійні сполуки [105].

Дезінфікуючий препарат «Бровадез-плюс», розроблений співробітниками НВП «Бровафарма» застосовували для проведення дезінфекції шляхом вологої обробки виробничих приміщень і обладнання у в концентрації 3% за діючою речовиною при експозиції 24 години і нормі витрати $1000 \text{ см}^3/\text{м}^2$.

Основні наукові результати розділу опубліковані в працях автора [361-378], Додаток А.



Рис. 3.5. Ультрацентрифугування осаду туберкулопротеїну за допомогою високообертового виробничого сепаратора малого об'єму. Фото авторів розробки.



Маса туберкулопротеїну з виробничого штаму *M. bovis* Vallee KMIEB-9KM, отриманого після осадження ТХО та ультрацентрифугування

Шпатель для зняття біомаси

Барaban високообертового виробничого сепаратору

Рис. 3.6. Зняття туберкулопротеїну з стінок барабану малооб'ємного високообертового виробничого сепаратору під час виготовлення серії №1 (Е) «Туберкуліну для ссавців очищеного». Фото авторів розробки.

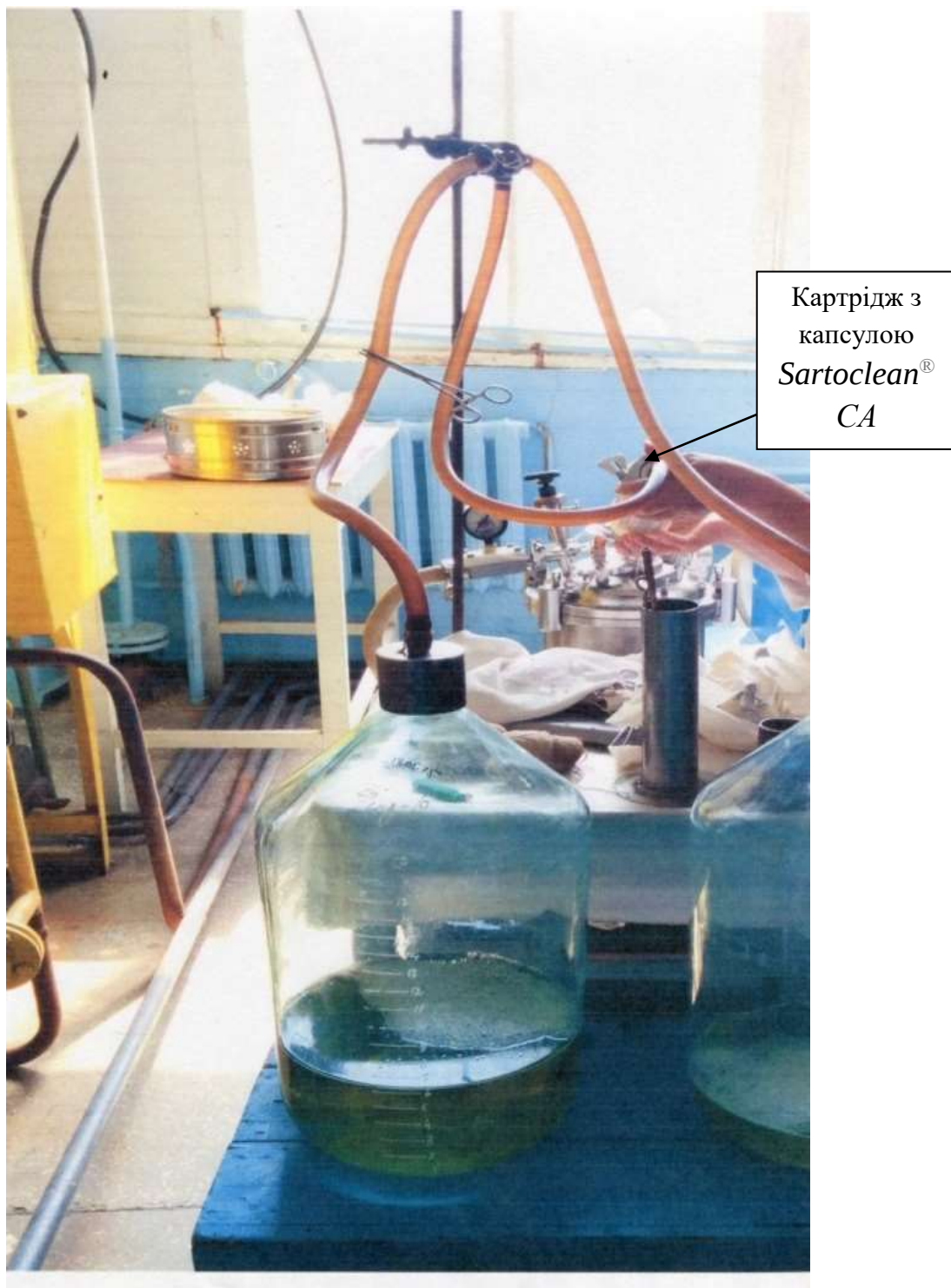


Рис. 3.7. Процес мікрофільтрації культуральної рідини після відділення бактеріальної маси *M. bovis* Vallee KMIEB-9KM з використанням капсул Sartoclean® CA з діаметром пор 0,45 мкм NBSP. Фото авторів розробки.

3.4 Розробка способу визначення активності ППД-туберкуліну для ссавців очищеного з використанням авірулентних *M. bovis*

Контроль активності ППД-туберкуліну для ссавців згідно ГОСТ 16739-88 передбачає використання хворих на туберкульоз (заражених збудником туберкульозу бичачого виду) тварин. Цей спосіб має суттєвий недолік. Робота з хворою на туберкульоз худобою може привести до розповсюдження інфекції. Для утримання хворих на туберкульоз тварин потрібні приміщення та умови, які відповідають вимогам епізоотичної та епідемічної безпеки. До того ж в Україні з 1976 року згідно з Інструкцією про заходи профілактики й боротьби з туберкульозом тварин і птиці, затвердженої у 1973 році ліквідовані туберкульозні ізолятори, тобто перетримку хворої на туберкульоз худоби заборонено.

При виготовленні алергену для діагностики туберкульозу ссавців на Сумському державному підприємстві – біологічна фабрика використовують "Спосіб контролю визначення активності туберкуліну очищеного ППД для ссавців"(Патент України № 36006 від 12.10.1999 р., розробники Кассіч Ю. Я., Завгородній А. І., Кассіч В. Ю. та ін.) та матеріали ДСТУ 4664:2006: «Туберкулін очищений для ссавців у стандартному розчині», що передбачає використання для сенсibilізації тварин живого 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.

В основу нашої роботи була поставлена задача розробити специфічний та безпечний для здоров'я тварин і людей спосіб визначення активності ППД-туберкуліну для ссавців очищеного в дослідках на морських свинках і великій

рогатій худобі з використанням інактивованої автоклавуванням бактеріальної маси *M. bovis* виробничого штаму *Vallee*.

Поставлене завдання вирішували шляхом сенсibilізації дослідних тварин непатогенними для них інактивованими (вбитими автоклавуванням) та (в якості контролю) атенуйованими культурами вакцинного штаму *M. bovis BCG*. На цих тваринах визначали активність туберкуліну. Тобто активність дослідної серії туберкуліну визначали порівнянням з контрольною серією препарату на здоровій великій рогатій худобі та морських свинках, яких попередньо сенсibilізували зависсю, інактивованої автоклавуванням культури *M. bovis Vallee*.

3.4.1 Визначення активності дослідних серій ППД-туберкуліну для ссавців очищеного на великій рогатій худобі. Визначення активності ППД-туберкуліну для ссавців проводили таким чином. Активність дослідної серії туберкуліну визначали порівнянням з контрольною серією препарату на здоровій великій рогатій худобі, яку попередньо сенсibilізували зависсю, інактивованої автоклавуванням культури *M. bovis Vallee*, суспендованої в стерильному вазеліновому маслі (дослід 1) та культурою мікобактерій вакцинного штаму БЦЖ (дослід 2). Контрольним тваринам культури мікобактерій не вводили.

Для сенсibilізації великої рогатої худоби готували завись, що містить 5 мг інактивованої автоклавуванням (за температури 100 °C впродовж трьох годин, або при 110 °C протягом однієї години) культури *M. bovis Vallee*, в об'ємі 5 см³ стерильного вазелінового масла або ізотонічного розчину (Дослід 1) та завись культури БЦЖ, що містить 5 мг бактеріальної маси в об'ємі 5 см³ ізотонічного розчину або стерильного вазелінового масла (Дослід 2). Для сенсibilізації морських свинок готували завись, що містить 1 мг інактивованої автоклавуванням культури *M. bovis Vallee*, в об'ємі 1 см³ стерильного вазелінового масла або ізотонічного розчину (Дослід 3), та завись культури БЦЖ, що містить 1 мг бактеріальної маси в 1 см³ (Дослід 4).

Дослід 1. Визначення активності ППД-туберкуліну для ссавців

очищеного на ВРХ, сенсibilізованій інактивованою автоклавуванням культурою *M. bovis Vallee*. Здоровій великій рогатій худобі віком 8 місяців і старше кількістю 18 голів підшкірно в ділянці підгруддя вводили 5 мг зависі інактивованої автоклавуванням бактеріальної маси *M. bovis* на стерильному вазеліновому маслі в об'ємі 5 см³. Визначення активності проводили через 30 діб після щеплення (сенсibilізації) ВРХ.

Тваринам вводили внутрішньошкірно в депільовані ділянки шкіри шиї, відповідно ліворуч та праворуч, по 0,1 см³ ППД туберкуліну для ссавців очищеного випробовуваної (експериментальної серії №1) та контрольної серій. В якості контрольної використовували серію № 32 «Туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців у стандартному розчині», придатна до 09.2016 р. виробництва Сумського державного підприємства біологічна фабрика. Реакцію визначали через 72 години й оцінювали за ступенем потовщення складки шкіри в місцях введення туберкуліну (в міліметрах) за допомогою кутиметра. Результати статистично обчислювали, порівнювали та визначали різницю у інтенсивності реакції на випробовувану й контрольну серії туберкуліну.

Випробовувану серію вважали активною, якщо немає різниці в інтенсивності зумовлених туберкулінами реакцій або вона статистично недостовірна.

Дослід 2. Визначення активності ППД-туберкуліну для ссавців очищеного на ВРХ, сенсibilізованій зависсю культури БЦЖ, що містить 5 мг бактеріальної маси в об'ємі 5 см³ ізотонічного розчину NaCl. Здоровій великій рогатій худобі віком близько 8 місяців кількістю 18 голів підшкірно в ділянці підгруддя вводили 5 мг зависі живої культури вакцини БЦЖ на стерильному фізіологічному розчині в об'ємі 5 см³. Визначення активності проводили через 30 діб після щеплення (сенсibilізації) ВРХ.

Тваринам вводили внутрішньошкірно в депільовані ділянки шкіри шиї, відповідно ліворуч та праворуч, по 0,1 см³ туберкуліну випробовуваної дослідної серії № 1 та контрольної серій туберкуліну. В якості контрольної

використовували серію № 32 «Туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців у стандартному розчині», придатна до 09.2016 р. виробництва Сумського державного підприємства біологічна фабрика. Реакцію визначали через 72 години й оцінювали за ступенем потовщення складки шкіри в місцях введення туберкуліну. Результати статистично обчислювали, порівнювали та визначали різницю у інтенсивності реакції на випробовувану й контрольну серії туберкуліну. Випробовувану серію вважали активною, якщо немає різниці в інтенсивності зумовлених туберкулінами реакцій або вона статистично недостовірна.

Облік алергічних реакцій проводили через 72 години після введення туберкулінів. Отримані результати вносили у відомість (Таб 3.8).

З матеріалів таблиці видно, що серед тварин, щеплених інактивованою культурою *M. bovis Vallee*, на туберкулін випробовуваної серії у порівнянні з препаратом контрольної серії реагували з більшою інтенсивністю реакцій $+/+$ 10 голів, з меншою $-/-$ 5 голів та з однаковою інтенсивністю $/=$ 3 голови.

Серед щеплених культурою БЦЖ тварин на туберкулін дослідної серії порівняно з контрольною реагували з більшою інтенсивністю реакцій $+/+$ 8 голів, з меншою $-/-$ 5 голів та з однаковою інтенсивністю $/=$ 5 голів худоби. Різниця в інтенсивності реакцій між дослідною та контрольною серіями у щеплених інактивованою бакмасою тварин ($3,9 \pm 0,3$ мм та $3,0 \pm 0,2$ мм, відповідно) і культурою БЦЖ ($6,9 \pm 0,8$ мм та $6,3 \pm 1,0$ мм, відповідно) статистично не достовірна ($p > 0,05$).

На підставі проведених експериментів на здоровій великій рогатій худобі, щепленій інактивованою культурою *M. bovis Vallee* (Дослід 1), та щепленій культурою БЦЖ (Дослід 2) визначено, що випробовувана дослідно-виробнича серія № 1 є активною і придатною для алергічного дослідження на туберкульоз. За активністю та специфічністю не поступається контрольній серії.

Таблиця 3.8.

Результати обліку алергічних реакцій на введення туберкуліну дослідної і контрольної серій у сенсibilізованої інактивованою культурою *M. bovis* Vallee KMIEB-9KM та вакциною БЦЖ ВРХ

Умовний порядковий номер тварини	Потовщення складки шкіри у мм у тварин				Наявність більшої +/+, меншої -/-, однакової /=/ реакції на туберкулін комерційної серії	
	Дослід 1:		Дослід 2:			
	Сенсибілізовані інактивованою культурою <i>M. bovis</i>		Сенсибілізовані вакциною БЦЖ			
	Експе- римен- тальна серія	Контроль- на серія	Експе- римен- тальна серія	Контроль- на серія	Сенсибілізовані :	
Інактивована- ною культурою <i>M. bovis</i>					вакци- ною БЦЖ	
1	1	5	3	4	-	-
2	2	негат.	негат.	негат.	+	=
3	3	3	7	5	=	+
4	7	4	3	1	+	+
5	3	4	10	10	-	+
6	5	4	14	9	+	+
7	1	2	7	5	-	+
8	9	4	7	1	+	+
9	2	1	негат.	негат.	+	=
10	1	1	6	10	=	-
11	6	4	4	5	+	-
12	4	2	19	19	+	=
13	3	3	10	7	=	+
14	5	3	8	10	+	-
15	1	2	5	3	-	+
16	7	3	8	8	+	=
17	7	4	9	13	+	-
18	2	3	4	4	-	=
Сума	69	52	124	114	+10; -5; =3.	+8; -5; =5.
$M \pm m$:	3,8±0,3	3,0±0,2	6,9±0,8	6,3±1,0		
p :	$p > 0,05$		$p > 0,05$			

Таким чином, способи визначення активності туберкуліну на щепленій інактивованою культурою *M. bovis Vallee* ВРХ та на щепленій вакцинним штамом БЦЖ худобі є однаково ефективними. Обидва способи можуть використовуватись для проведення контролю активності ППД-туберкуліну для ссавців. Спосіб контролю активності туберкуліну на великій рогатій худобі, щепленій інактивованою бактеріальною масою *M. bovis Vallee* є ефективним, активним та специфічним, а до того ж безпечним для здоров'я тварин і людей і запобігає розповсюдженню живих мікобактерій в природі.

3.4.2 Визначення активності дослідної серії ППД-туберкуліну для ссавців очищеного на мурчаках.

Дослід 3. Сенсibilізація мурчаків інактивованою автоклавуванням культурою *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ. Десяти здоровим морським свинкам-альбіносам або з білими боками внутрішньом'язово вводили по 1 мг зависі інактивованих автоклавуванням *M. bovis Vallee* на стерильному ізотонічному розчині хлористого натрію в об'ємі 1 см³.

Дослід 4. Сенсibilізація мурчаків культурою БЦЖ. Десяти морським свинкам другої групи вводили по 1 мг зависі культури БЦЖ на стерильному ізотонічному розчині хлориду натрію в об'ємі 1 см³.

Всіх дослідних морських свинок використовували для визначення активності випробовуваної експериментальної серії № 1 ППД-туберкуліну для ссавців очищеного через 30 діб після щеплення.

Виготовлення розведень туберкуліну. Готували суміш з п'яти флаконів туберкуліну випробовуваної серії. 1 см³ туберкуліну переносили у пробірку з 9 см³ стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію й перемішували. З цієї пробірки 1 см³ розчину туберкуліну переносили у другу пробірку з 4 см³ стерильного ізотонічного розчину і таким чином отримували перше («1») розведення туберкуліну. З другої пробірки 1 см³ розчину туберкуліну переносили у пробірку з 9 см³ стерильного ізотонічного розчину й отримували друге («2») розведення туберкуліну.

Таким же методом готували розведення «3» та «4» контрольної серії туберкуліну, що містять у 1 см^3 1000 і 100 МО, відповідно.

Для виготовлення розведень контрольної серії туберкуліну використовували п'ять флаконів алергену з таким розрахунком, щоб у 1 см^3 містилось 50000 МО.

Перед проведенням випробування (за 5 діб) шерсть по боках морських свинок вибривали. Виготовлені розведення алергенів (1, 2, 3, 4) вводили внутрішньошкірно кожній морській свинці в депільовані ділянки шкіри в дозі $0,1\text{ см}^3$ по два розведення з кожної сторони тіла в умовні місця ін'єкцій: а, б, в, г. Відстань між місцями введення з кожної сторони тіла була не меншою 40 мм.

Кожне розведення туберкуліну вводили по $0,1\text{ см}^3$ окремим шприцом, номер якого відповідає номеру розведення препарату. Шприци з набраним розчином розташовували на кришці стерилізатора за їх порядковими номерами (1, 2, 3, 4). В місці введення утворювалась випуклість величиною з горошину. Після ін'єкції розведення першій свинці перший шприц з цим розведенням клали у кінець рядка, за шприцом № 4. Решту шприців після введення розчинів алергенів клали на попередні місця. Ін'єкцію розчину туберкуліну другій свинці робили шприцом № 2, який потім клали праворуч за шприцом № 1. Решту шприців після введення розчинів алергенів клали на попередні місця. Таким чином, умовний номер кожної свинки відповідав номеру розведення, яке вводили цій свинці першим шприцом в умовне місце ін'єкції. Кожну свинку після ін'єкції їй розведення туберкуліну мітили фарбою, що не змивається. Тварин, яким розведення туберкуліну вводили в одному порядку, мітили одною міткою. Порядок маркування і введення туберкуліну морським свинкам наведений у таблиці 3.9.

Таблиця 3.9.

Порядок маркування і введення туберкуліну морським свинкам

Умовний номер свинки	Місце мітки	Розведення туберкуліну, що введені в умовні місця ін'єкції			
		ліворуч від голови		праворуч від ГОЛОВИ	
		а	б	в	г
1	Мітка не наноситься	1	2	3	4
2	Голова	2	3	4	1
3	Спина	3	4	1	2
4	Крижі	4	1	2	3
5	Мітка не наноситься	1	2	3	4
6	Голова	2	3	4	1
7	Спина	3	4	1	2
8	Крижі	4	1	2	3
9	Мітка не наноситься	1	2	3	4
10	Голова	2	3	4	1

Обробка результатів. Інтенсивність реакції визначали через 24 години після введення препаратів шляхом обліку діаметра папули, що виникла в місці введення туберкуліну. Для цього обводили чорнилом контур папули. Потім на бік тварини клали лист целофану й перемальовували на нього усі контури з позначенням місць ін'єкцій: а, б, в, г. На лист целофану перемальовували контури папул усіх морських свинок групи з позначенням умовного номера кожної тварини. Для визначення активності туберкуліну лист целофану клали на міліметровий папір і вимірювали значення поперечного та подовжнього діаметрів кожної папули. Обчислювали їх

середню величину й результати заносили у Табл. 3.10 (Дослід 3) та Табл. 3.11 (Дослід 4).

Таблиця 3.10.

Інтенсивність реакції на введення розведень туберкуліну мурчакам, сенсibilізованим інактивованою культурою *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ

Умовний номер свинки, розведення	Інтенсивність реакції на введення розведень туберкуліну (мм)			
	1	2	3	4
1	20,5	8,0	20,0	10,5
2	24,0	7,5	22,5	11,5
3	15,5	9,0	16,0	7,5
4	17,0	10,0	21,5	13,0
5	20,0	11,5	18,0	10,0
6	18,5	9,0	14,0	8,5
7	21,0	11,0	22,5	10,9
8	25,5	11,0	27,5	11,0
9	10,5	7,0	10,5	1,0
10	10,0	3,0	9,0	3,0
Всього:	182,5	87,0	181,5	95,0
$M \pm m$:	182,5 $\pm$ 14,1	87,0 $\pm$ 8,2	181,5 $\pm$ 11,1	95,0 $\pm$ 10,3

При обробці результатів випробування враховували лише свинок, які реагували на усі розведення туберкуліну. Для визначення активності препарату кількість морських свинок, які реагували на усі розведення туберкуліну, не повинна бути менше десяти.

Таблиця 3.11.

Інтенсивність реакції на введення розведень туберкуліну морським свинкам, сенсibilізованим культурою БЦЖ

Умовний номер свинки, розведення	Інтенсивність реакції на введення розведень туберкуліну (мм)			
	1	2	3	4
1	20,0	7,0	21,0	11,5
2	23,5	7,5	21,0	10,0
3	16,5	7,0	16,0	7,5
4	18,0	8,0	19,0	12,0
5	19,0	14,5	19,0	11,0
6	19,5	9,0	14,0	7,5
7	20,0	9,0	22,5	10,5
8	24,5	16,0	25,5	12,0
9	12,5	5,0	9,5	4,0
10	10,0	5,0	10,0	10,0
Всього:	183,5	88,0	179,5	98,0
$M \pm m$:	183,5±14,3	88,0±11,2	179,5±16,5	98,0±8,2

Визначення активності випробовуваної серії ППД-туберкуліну для ссавців з використанням морських свинок, сенсibilізованих інактивованою автоклавуванням культурою *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ (Дослід 3). 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.

Обчислювали суму середніх діаметрів папул випробовуваної серії туберкуліну (d_1) і суму середніх діаметрів папул на контрольну серію туберкуліну (d_2):

$$d_1 = 182,5 + 87,0 = 269,5 \text{ мм}$$

$$d_2 = 181,5 + 95,0 = 276,5 \text{ мм}$$

Активність випробовуваної серії туберкуліну:

$$A = \frac{269,5}{276,5} 50000 = 48734 \approx 49000 \text{ МО / мг},$$

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

Визначення активності випробовуваної серії ППД-туберкуліну для ссавців з використанням морських свинок, сенсibilізованих живою культурою БЦЖ (Дослід 4). Обчислювали суму середніх діаметрів папул випробовуваної серії туберкуліну (d_1) і суму середніх діаметрів папул на контрольну серію туберкуліну (d_2):

$$d_1 = 183,5 + 88,0 = 271,5 \text{ мм}$$

$$d_2 = 179,5 + 98,0 = 277,5 \text{ мм}$$

Активність випробовуваної серії туберкуліну:

$$A = \frac{271,5}{277,5} 50000 = 48916 \approx 49000 \text{ МО / мг},$$

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

Таким чином, результати визначення активності ППД-туберкуліну на морських свинках, сенсibilізованих живою культурою БЦЖ та інактивованою автоклавуванням культурою *M. bovis* співпадають і становлять 49000 МО/мг, тобто є однаково ефективними.

Обидва способи можуть використовуватись для проведення контролю активності ППД-туберкуліну для ссавців. Проте, спосіб сенсibilізації тварин інактивованою автоклавуванням бактеріальною масою *M. bovis* попереджає розповсюдження живих мікобактерій в зовнішньому середовищі і тому є

екологічно безпечним.

Таким чином, розроблений спосіб визначення активності ППД-туберкуліну для ссавців на великій рогатій худобі та морських свинках, сенсibilізованих інактивованою автоклавуванням суспензією культури *M. bovis* є специфічним та безпечним для здоров'я тварин і людей і запобігає розповсюдженню живих мікобактерій в природі. Спосіб сенсibilізації сільськогосподарських та лабораторних тварин інактивованими та авірулентними атенуйованими мікобактеріями може використовуватись для визначення активності ППД-туберкуліну для ссавців. Основні наукові результати розділу опубліковані в працях автора [361-378], Додаток А.

3.5 Контроль якості експериментальної серії ППД-туберкуліну для ссавців очищеного

Для алергічних досліджень на туберкульоз в Україні використовують туберкулін очищений (ППД) для ссавців у стандартному розчині, розроблений фахівцями лабораторії туберкульозу ІЕКВМ (Ю. Я. Кассіч, А. І. Завгородній, В. Ю. Кассіч та ін., 1999, 2002, 2004). Препарат виготовляє Сумське державне підприємство – біологічна фабрика. В країнах Європи туберкулінізацію тварин проводять Згідно Директиви Ради ЄС 97/12 з використанням туберкулінів *PPD* або *HCSM*, виробничими штамами в яких є *M. bovis* «AN5» або «Vallee», в той час як при виготовленні «Туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців в стандартному розчині» ТУУ 24.00497087.645-2001, основним виробничим штамом є «*M. bovis* ІЕКВМ-1». Тому, на сьогоднішній день, актуальним напрямком досліджень є гармонізація з Європейськими вимогами та впровадження у виробництво вітчизняних ППД-туберкулінів, що відповідають стандартам ЄС.

У зв'язку із вищесказаним, на Херсонському державному підприємстві – біологічна фабрика під науковим керівництвом професора В. Ю. Кассіча та аспіранта О. В. Кассіча було розроблено та впроваджено у виробництво ППД-туберкулін для ссавців очищений з використанням виробничого штаму

M. bovis Vallee KMIEB-9KM та технологічних прийомів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування (Додаток Н).

Визначення активності дослідно-виробничої серії № 1 (Е) описано в попередньому розділі роботи. Черговим етапом нашої роботи було проведення заключного контролю якості експериментальної (дослідно-виробничої) серії № 2 (Е) ППД-туберкуліну для ссавців очищеного, виготовленої у червні 2016 року Херсонським державним підприємством – біологічна фабрика. Серія препарату призначена для проведення державних іспитів даного препарату.

Надалі наводяться результати визначення якості експериментальної серії очищеного *PPD*-туберкуліну для ссавців за № 2 (Е).

Маркування, зовнішній вигляд, наявність сторонніх домішок. ППД-туберкулін для ссавців серії № 2 (Е) має вигляд дещо опалесцюючої рідини світло-коричньового кольору з сіруватим осадом, який при струшуванні розбивається в гомогенну завись, порушення герметичності і тріщин флаконів відсутнє. Маркування флаконів відповідає вимогам ДСТУ 4664:2006 : «Туберкулін очищений для ссавців у стандартному розчині».

Визначення контамінації бактеріальною та грибовою мікрофлорою. Провели висів туберкуліну згідно ДСТУ 4483 на середовища ТГС, МПА та Сабуро. Заключний облік результатів висіву провели через 14 діб. Росту на середовищах бактеріальної та грибної мікрофлори не виявлено. Висновок: препарат вільний від контамінації бактеріальною та грибовою мікрофлорою.

Визначення концентрації водневих іонів. Визначили концентрацію водневих іонів (*pH*), використовуючи потенціометр. Результат: (*pH*) у дослідній серії дорівнює 7,3. Висновок: результат відповідає вимогам ДСТУ 4664:2006.

Визначення масової частки білка. Визначили масову частку білка в туберкуліні за методом К'ельдаля. Результат: масова частка білка у дослідній

серії дорівнює $0,85 \text{ мг/ см}^3$. Висновок: результат контролю відповідає вимогам нормативної документації.

Визначення масової частки гліцерину. За допомогою ареометра визначали щільність стандартного розчину туберкуліну та щільність фізіологічного розчину хлористого натрію з масовою часткою $0,85\%$. Відрахування показників шкали ареометра проводили за нижнім меніском рідини в циліндрі. Результат: масова частка гліцерину у дослідній серії дорівнює $(10,05) \%$. Висновок: результат контролю відповідає вимогам нормативної документації.

Визначення масової частки хлориду натрію у стандартному розчині туберкуліну. Визначали масову частку хлориду натрію згідно з «Інструкцією по виготовленню і контролю ППД-туберкуліну для ссавців очищеного» та ДСТУ 4664:2006. Результат: масова частка хлориду натрію у дослідній серії дорівнює $0,84\%$. Висновок: результат контролю відповідає вимогам нормативної документації.

Визначення масової частки фенолу в стандартному розчині туберкуліну. Визначали масову частку фенолу згідно з «Інструкцією по виготовленню і контролю ППД-туберкуліну для ссавців очищеного» та ДСТУ 4664:2006. Результат: масова частка фенолу у дослідній серії дорівнює $0,3 \%$. Висновок: результат контролю відповідає вимогам нормативної документації.

Визначення реактогенності. Трьом здоровим морським свинкам-альбіносам вводили внутрішньошкірно з одного боку по 500 МО туберкуліну в об'ємі $0,1 \text{ см}^3$ туберкулін випробовуваної серії, з другого – контрольну серію туберкуліну в тій же дозі. В якості контрольної використовували серію № 32 «Туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців у стандартному розчині», придатна до 09.2016 р. виробництва ДП Сумська біологічна фабрика. Результат. Через 24 години на місці введення туберкуліну запалення не виявлено. Висновок: дослідна серія туберкуліну № 2 (Е) не реактогенна.

Визначення відсутності сенсibiliзуючих властивостей. Трьом морським свинкам-альбіносам ввели внутрішньошкірно з одного боку по 500 МО туберкуліну в об'ємі 0,1 см³. Ще трьох свинок утримували разом з щепленими.

Через 5 та 10 діб провели повторну ін'єкцію туберкуліну. Через 16 діб після останньої ін'єкції туберкуліну трьом дослідним і трьом контрольним свинкам ввели внутрішньошкірно по 500 МО туберкуліну в об'ємі 0,1 см³.

Реакцію враховували через 24 години після ін'єкції туберкуліну. Заключний облік результатів на перевірку відсутності сенсibiliзуючих властивостей провели через 24 години. Результат: реакція запалення у морських свинок на місці введення препарату відсутня. Висновок: у туберкуліну дослідної серії сенсibiliзуючі властивості відсутні.

Визначення активності. Активність випробовуваної серії туберкуліну в міжнародних одиницях (МО) визначали порівнянням її з контрольною серією туберкуліну на сенсibiliзованих культурою мікобактерій БЦЖ морських свинок.

Провели сенсibiliзацію 10 морських свинок-альбіносів, яким вводили 1 мг зависі живої культури вакцини БЦЖ на фізіологічному розчині в об'ємі 1 см³.

Через 30 діб 10 морським свинкам в депільовані ділянки шкіри ввели по 0,1 см³ розведення: дослідний туберкулін розведення 1 (1000 МО в 1 см³), розведення 2 (100 МО в 1 см³), та контрольний туберкулін розведення 3 (1000 МО в 1 см³), розведення 4 (100 МО в 1 см³). Інтенсивність реакцій визначали через 24 години після введення препаратів шляхом обліку діаметра папули, що виникла на місці введення туберкуліну. Результати визначення інтенсивності реакцій на введення розведень туберкуліну наведені в таблиці 3.12.

Таблиця 3.12.

Визначення активності туберкуліну на морських свинках

Умовний № свинки, розведення	Інтенсивність реакції на введення розведень туберкуліну (мм)			
	1	2	3	4
1	16,2	10,2	17,9	9,9
2	17,8	8,7	16,6	10,8
3	25,4	10,8	23,0	11,6
4	18,7	9,9	26,5	12,8
5	20,9	10,8	19,7	12,2
6	24,8	9,7	15,8	9,5
7	20,7	8,2	19,9	11,8
8	19,2	12,0	20,6	10,6
9	16,5	8,8	25,4	11,9
10	22,6	9,2	17,8	12,8
Всього	202,8	98,3	203,2	113,9
M±m :	202,8±15,5	98,3±3,8	203,2±10,7	113,9±3,5

Одержані результати вимірювань обчислювали за формулою:

$$A = d_1 : d_2 \times 50000$$

Обчислювали суму середніх діаметрів папул випробовуваної серії туберкуліну (d_1) і суму середніх діаметрів папул на контрольну серію туберкуліну (d_2):

$$d_1 = 202,8 + 98,3 = 301,1 \text{ мм}$$

$$d_2 = 203,3 + 113,9 = 317,1 \text{ мм}$$

Результат: Активність випробовуваної серії туберкуліну становить:

$$A = \frac{301,1}{317,1} \times 50000 = 47000 \text{ МО/мг,}$$

Різниця в інтенсивності реакцій на дослідну (301,1 мм) та контрольну (317,1 мм) серії не достовірна ($P > 0,05$).

Висновок: дослідна серія туберкуліну активна.

Заключний висновок: Серія № 2 (Експериментальна) туберкуліну очищеного (ППД), виготовлена у червні 2016 року Херсонським державним підприємством – біологічна фабрика, відповідає вимогам ДСТУ 4664:2006 та придатна до використання. Таким чином, за результатами біологічного контролю, виготовлена з дотриманням ДСТУ 4664:2006 Херсонським державним підприємством – біологічна фабрика експериментальна Серія № 2 (Е) ППД-туберкуліну очищеного для ссавців відповідає вимогам згаданого ДСТУ та придатна до використання і проведення державних випробувань.

3.5.1 Висновок до розділу 3. В роботі теоретично та експериментально обґрунтовані та проведені дослідження щодо розробки, гармонізації з вимогами ЄС та впровадження у виробництво на Херсонському державному підприємстві – біологічна фабрика 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 доведено високу протеїногенність виробничих штамів та діагностичну активність і специфічність дослідно-виробничих серій алергену. За результатами біологічного контролю, виготовлені з дотриманням ДСТУ 4664:2006 експериментальні Серії № 1(Е) та № 2 (Е) ППД-туберкуліну очищеного для ссавців відповідають вимогам згаданого ДСТУ та придатні до використання і проведення державних випробувань. Основні наукові результати розділу опубліковані в працях автора [361-378], Додаток А.

РОЗДІЛ 4.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Документи МЄБ та ЄС в якості основного методу для 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 фахівцями лабораторії туберкульозу ННЦ ІЕКВМ НААН України [71, 75, 100, 101, 103, 137, 148], який виготовляють з використанням виробничих штамів *M. bovis* ІЕКВМ-1, *M. bovis* № 4, тощо.

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 виготовляють з виробничих штамів *M. bovis* «AN5» або «Valle» [151, 192, 193]. Тому, на сьогоднішній день актуальним напрямком досліджень є гармонізація вітчизняних ППД-туберкулінів у відповідності до вимог ЄС.

До того ж, згідно Законів України [77-79], усі закупівлі в Державі здійснюються на тендерній (конкурсній) основі, за принципами добросовісної конкуренції серед учасників, максимальної економії та ефективності, об'єктивної та неупередженої оцінки пропозицій конкурсних торгів, свободи надання послуг, тощо, в той час як ППД-туберкуліни в Україні нині виготовляє лише одне підприємство. Таким чином, розробка, впровадження та випуск ППД-туберкуліну для ссавців крім Сумського, ще й Херсонським державним підприємством – біологічна фабрика, сприяє впровадженню державної політики тендерних закупівель.

Перелічені факти переконливо свідчать, що тваринництво України при поголів'ї 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. З матеріалів звітності Державної служби ветеринарної медицини відомо, що за 2016 рік проведено 3,4 млн. алергічних досліджень на туберкульоз [247, 248].

Таким чином, на сьогоднішній день для ветеринарної медицини України актуальним напрямком досліджень є пошук та впровадження у виробництво високопротейногенних виробничих штамів *M. bovis* для виготовлення туберкулінів, розробка ефективних і високопродуктивних живильних середовищ для їх культивування, а також оптимізація технології виготовлення і контролю, розробка нових та оптимізація і гармонізація існуючих вітчизняних алергенів у відповідності з вимогами ЄС.

Відомо, що при виготовленні ППД-туберкуліну найбільш вразливою ланкою технологічного процесу є глибинна стерилізуюча фільтрація через азбестові фільтри. Застосування азбестових глибинних фільтрів не дозволяє одержати гарантовано стерильний препарат. Крім того, використання глибинних фільтрів призводить до значних втрат білка, що знижує вихід препарату [19, 149, 237]. 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 протеїну [18, 149]. В. Ю. Кассічем (2004), А. І. Завгороднім з співав. (2007), І. М. Дегтярьовим (2009) розроблені методи отримання препарату з використанням фільтраційних установок типу УПВ на порожнистих волокнах [52, 53, 71, 114, 115]. В. Е. Козловим з співавт. (2002, 2005, 2007) було визначено, що туберкулін, виготовлений із застосуванням методів мембранного фракціонування з молекулярною масою від 3 до 300 кДа, має найбільшу специфічну активність [149, 150].

В. М. Безгіним та В. Е. Козловим (2012) показано, що видалення високомолекулярної фракції з препарату підвищує питомий вміст білка та специфічність діагностикума і, одночасно зменшує реактогенність алергену [19-21]. А. А. Гриньовим (1973), Н. В. Безгиною з співав. (2008) було доведено, що застосування методів мембранного фракціонування білків культуральної рідини мікобактерій дозволяє за рахунок зниження вмісту в туберкуліні баластних антигенів знизити реактогенність алергену [20, 21, 42]. В. Е. Козлов з співав. (2008) розробили спосіб фракціонування обезсоленого концентрату туберкулопротеїну на ультрафільтраційних мембранах с *НОММ* 150-1000 кДа. Спосіб дозволяє одержати високоспецифічний, не сенсibiliзуючий організм тварини препарат, технологічний у виготовленні, а також підвищити вихід туберкуліну. Таке стало можливим завдяки використанню ультрафільтрації розчину білків, виділених з культуральної рідини, на мембранах с *НОММ* 150-1000 кДа та наступній мікрофільтрації білкового розчину на мембранах з розміром пор 0,2 мкм. Показана перспективність застосування методів мембранної технології з метою збільшення економічної ефективності та екологічної безпеки виробництва [19, 149, 237].

Тому, актуальним та перспективним є впровадження в технологічний процес виготовлення ППД-туберкуліну мембранних технологій, використання методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування культуральної рідини та осаду туберкулопротеїну.

На підставі наведених фактів на державному підприємстві – Херсонська біологічна фабрика проведено роботу з розробки та впровадження у виробництво ППД-туберкуліну для ссавців, виготовленого з використанням виробничого штаму *M. bovis Vallee KMIEB-9KM* та методів мембранної мікрофільтрації і ультрацентрифугування (сепарування) культуральної рідини та осаду туберкулопротеїнів.

Першим етапом роботи був підбір виробничих штамів. Для цього провели адаптацію, селекцію, вивчення морфологічних, культуральних та

біологічних властивостей та депонування виробничого штаму *M. bovis Vallee*, оскільки саме цей штам разом із штамом *AN5* рекомендує Директива Ради ЄС 97/12 від 17.03.1997 р. в якості виробних при виготовленні ППД-туберкульозу для ссавців. При цьому, за даними В. Е. Козловаз співав. (2003, 2004, 2006, 2007), штам *M. bovis AN5*, за своїми імунобіологічними ознаками ідентичний до штаму *M. bovis Vallee*, відповідає вимогам до виробничих штамів і, поряд із штамом *M. bovis № 8*, може бути використаний для виробництва ППД-туберкуліну для ссавців [149, 150]. Нині при виробництві ППД-туберкуліну для ссавців в Україні використовують штам *M. bovis ІЕКВМ-1* [71, 75, 100, 101, 103, 137, 148].

Суттєвим недоліком всіх виробничих штамів *M. bovis* є тривалий ріст, повільне накопичення бактеріальної маси мікобактерій в процесі їх культивування і, відповідно, низький вихід кінцевого продукту – туберкуліну. Тому була проведена робота щодо селекції високопротеїногенного швидкоростучого виробничого штаму.

Поставлене завдання вирішували шляхом того, що одержаний в рамках творчого обміну з РУП «ІЕВ» ім. С. Н. Вишелеського (м. Мінськ) сублімований штам збудника туберкульозу бичачого виду, який згідно паспорту штаму має назву «*M. bovis Vallee* КМІЕВ-9» (Додаток А.1) розконсервували та адаптували до щільних елективних живильних середовищ Павловського, Левенштейна-Ієнсена, ІЕКВМ, та рідких синтетичних живильних середовищ 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 стимулюючою дозою гамма-випромінювання 0,0387 Кл/кг (150 Р) за методикою В. Ю. Кассіча (2004). Після опромінення 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 Левенштейна-Ієнсена, Павловського та Сотона ХБ [114, 115]. При цьому прискорення швидкості росту культур було статистично не

достовірним. Змін ультраструктури мікроорганізмів під час електронномікроскопічних досліджень не спостерігали. Проте, при культивуванні штаму збудника туберкульозу бичачого виду на живильному середовищі Сотона КФ для прискореного накопичення бактеріальної маси впродовж 2-3 генерацій було відзначено прискорення росту мікобактерій і підвищення накопичення бактеріальної маси. Тобто середовище Сотона КФ мало стимулювальні та селективні властивості, що призвело до отримання штаму з прискореним ростом мікобактерій: культура мікобактерій починала рости раніше на $(4,5 \pm 1,5)$ діб і давала більше накопичення бактерійної маси: мікробна плівка формувалася на $(4,1 \pm 0,9)$ діб раніше, в порівнянні з вихідним штамом.

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». Одержаний штам являє собою фенотиповий модифікант штаму збудника туберкульозу бичачого виду *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9.

Експериментальним шляхом було доведено, що при використанні запропонованого нами штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ ріст та формування плівки мікобактерій у флаконі з середовищем починався раніше на $(3,0 \pm 1,0)$ доби, а за період культивування вихід бактеріальної маси з одного флакону був вищим на $(16,1 \pm 1,1)$ мг. Масова частка білка в пробі туберкуліну, виготовленого з штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ була достовірно більшою ($P < 0,05$) і становила $(1,20 \pm 0,3)$ мг/см³, в той час, як в пробі туберкуліну з штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 масова частка білка становила $(0,89 \pm 0,1)$ мг/см³.

Таким чином, запропонований виробничий штам мікобактерій *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ при культивуванні на синтетичному живильному середовищі Сотона ХБ або КФ дозволяє прискорити ріст і підвищити накопичення бактерійної маси мікобактерій з одного флакону з $(59,5 \pm 3,5)$ до

(75,6±4,7) мг на (16,1±0,2) мг і дає можливість відповідно збільшити вихід туберкуліну до (1,20) мг/см³.

Результати досліджень використані при проведенні 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 ці штами можуть використовуватись для виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців.

Наступним етапом роботи була розробка середовищ Сотона КФ та Сотона ХБ для виробничого культивування штамів *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 та *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ.

Під час виконання підготовчих робіт в 2010-2011 рр. нами було розроблене «Синтетичне живильне середовище Сотона КФ для прискореного накопичення бактеріальної маси мікобактерій» з ростовими факторами (вітамінами B_1 та B_{12}) (Патент України на корисну модель № 63246), використання якого дозволило отримати новий виробничий штам з прискореним ростом та накопиченням бактеріальної маси. Штам одержав назву *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ (Додатки В, Д).

В 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. При цьому за основу взяли середовище Сотона, що пропонує Індійська компанія *HIMEDIA*, доступне за складом та вартістю компонентів. Модифікація цього середовища полягала в додаванні до основного складу інгредієнтів вітамінів групи *B*, як факторів росту. При цьому досліджували декілька варіантів середовищ, які відрізнялись кількісним вмістом вітамінів B_1 та B_{12} .

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 $(2,0 \pm 1,0)$ доби і накопичення бактерійної маси мікобактерій на $(5,8 \pm 1,9)$ мг, що підвищує вихід кінцевого продукту (туберкуліну) з одиниці об'єму середовища.

Третім 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 атипових мікобактерій (КАМ, ААМ) є протеїни мікобактерій, які містяться у фільтратах культур. Принцип отримання очищеного деривату туберкулопротеїну (*Purified Protein Derivatив – 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 і Ф. І. Осташком, 1952, 1956; Гриневым А. А., 1973; Шевыревым Н. С., 1999, 2003; Ю. М. Мясоедовым, 2006; Безгиним В.М., 2007, 2008, 2016; Безгиною Н. В., 2006, 2008; В. Е. Козловым, 2004, 2007; Ю. Я. Кассічем., В. Ю. Кассічем, А. І. Завгороднім, В. В. Блушко (2001, 2004, 2006, 20011, 2014); та іншими дослідниками [17-24, 42, 149, 150, 244].

Суттєвим 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 рамні азбестові фільтри, що не дозволяє одержати гарантовано стерильний препарат та призводить до втрат на таких фільтрах значної кількості білка й води.

Для уникнення означених недоліків був розроблений спосіб одержання туберкуліну з використанням ультрафільтраційних мембран (В. Е. Козловз

співав., 2004). Зазначений спосіб полягає у фракціонуванні знесоленої крупномолекулярної фракції та концентрату туберкуліну на ультрафільтраційних мембранах з *НОММ* 150 – 1000 кДа. Визначено, що туберкулін, виготовлений із застосуванням методів мембранного фракціонування з молекулярною масою від 3 до 300 кДа, має найбільшу специфічну активність [149, 150].

В. М. Безгіним та В. Е. Козловим (2012) показано, що видалення високомолекулярної фракції з препарату підвищує питомий вміст білка та специфічність діагностикума і, одночасно зменшує реактогенність алергену. За даними О. П. Лисенка (1989) в ППД-туберкуліні для ссавців специфічна активність пов'язана з фракцією протеїнів культуральної рідини *M. bovis*, з 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 %) [17, 149, 150].

Нами пропонується обробка культуральної рідини після відділення бактеріальної маси методом мембранної мікрофільтрації з використанням капсул *Sartoclean*[®] *CA* з діаметром пор 0,45 мкм *NBSP* та *НОММ* 150 – 1000 кДа і відділення білкових фракцій туберкуліну після осадження їх трихлороцтовою кислотою шляхом ультрацентрифугування при 14 тис. об/хв. з подальшою стерилізуючою мікрофільтрацією одержаних пермеатів через капсули *Sartoclean*[®] *CA* з діаметром пор 0,2 мкм.

Моношарові фільтри *Sartoclean*[®] *CA* з діаметром пор 0,45-0,2 мкм (*NBSP*) та *НОММ* 150 – 1000 кДа забезпечують найвищий вихід протеїну при утримуючій мікробній фільтрації. За даними В. М. Безгіна, В. Е. Козлова (2012), О. П. Лисенко з співав. (1999) білкові фракції мікобактерій з молекулярною масою 150 – 1000 кДа в туберкуліні мають найвищі показники діагностичної активності та специфічності [17, 149, 150, 164]. Відомо, що мембрани з ацетату целюлози в фільтрах *Sartoclean*[®] *CA* є мембранним матеріалом з найнижчою неспецифічною зв'язувальною здатністю, що

забезпечує найбільший вихід протеїну і, тим самим, підвищує ефективність технології. Завдяки «вбудованій системі попередньої фільтрації», необхідній для забезпечення економічності компоновки системи, фільтри *Sartoclean®CA* з гетерогенним подвійним шаром забезпечують найвищі показники загальної пропускної здатності (Інструкція з експлуатації).

Експериментальним шляхом нами було доведено, що при використанні для виготовлення туберкуліну технології з застосуванням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування в препараті достовірно ($P < 0,05$) збільшуються вихід протеїну 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.

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

За рахунок використання ультрафільтраційних мембран с *HOMM 150 – 1000* кДа та капсул *Sartoclean®CA* з діаметром пор $0,2\text{--}0,45$ мкм NBSP препарат виходить 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 білка та води.

При дослідженні препаратів *M. bovis*, опромінених за методикою В. Ю. Кассіча [114, 115] «стерилізуючими» дозами γ -випромінюванням $154,8\text{--}206,4$ Кл/кг (600 тис.– 800 тис. Р), встановлено, що ріст та репродукція їх на живильних середовищах припиняється, настає «репродуктивна загибель». Клітини мікобактерій при таких дозових навантаженнях набувають розмиті контури, обезбарвлену цитоплазму, яскраво визначену деструктивну зернистість, відзначається частковий розпад оболонки. Метод радіаційної стерилізації мікобактерій виявився ефективним і економічним в

лабораторних умовах, але не технологічним – не придатним для використання в процесі виготовлення туберкуліну за відсутністю необхідного обладнання.

Ряд науковців (О. С. Донченко з співав., 2004, 2008; А. І. Завгородній з співав., 2007; В. В. Білушко з співав., 2007; І. М. Дегтярьов, 2009) пропонують метод виготовлення туберкуліну з бактеріальної маси мікобактерій після дезінтеграції її ультразвуком [23, 51-53, 71]. Під час розробки технології виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців очищеного нами випробувано комплексний метод отримання туберкулопротеїну одночасно з культуральної рідини і бактеріальної маси виробничого штаму (Додаток К). При цьому розчини туберкулопротеїну, одержані із культурального фільтрату та бактеріальної маси змішували у співвідношенні 1:10, доводили рН до $(7,0 \pm 0,2)$ й піддавали діалізу. Результати дослідів свідчать, що достовірно вищим ($P < 0,05$) вихід протеїну на 1 л середовища був при використанні комплексного методу отримання з культурального фільтрату та бактеріальної маси і становив $(1100,0 \pm 7,2)$ мг, в той час як вихід туберкулопротеїну з культурального фільтрату та з бактеріальної маси становив $(91,0 \pm 4,2)$ та $(130,0 \pm 3,2)$ мг, відповідно. Проте, зазначений спосіб не використовували під час виготовлення експериментальних серій препарату та складання технологічного регламенту як занадто працемісткий та за відсутності промислового обладнання.

Наступним етапом роботи була розробка способу визначення активності очищеного (ППД) туберкуліну для ссавців на тваринах, сенсibiliзованих авірулентними культурами *M. bovis*. Державний стандарт СРСР – ГОСТ 16739-88 передбачає контроль активності ППД-туберкуліну для ссавців з використанням хворих на туберкульоз (заражених збудником туберкульозу бичачого виду) тварин. Цей спосіб має суттєвий недолік. Робота з хворою на туберкульоз худобою може привести до розповсюдження інфекції. Для утримання хворих на туберкульоз тварин потрібні приміщення та умови, які

відповідають вимогам епізоотичної та епідемічної безпеки. До того ж в Україні з 1976 року згідно з Інструкцією про заходи профілактики й боротьби з туберкульозом тварин і птиці, затвердженої у 1973 році ліквідовані туберкульозні ізолятори, тобто перетримку хворої на туберкульоз худоби заборонено [114, 115]. При виготовленні ППД-туберкуліну для діагностики туберкульозу ссавців Сумським державним підприємством – біологічна фабрика використовують "Спосіб контролю визначення активності туберкуліну очищеного ППД для ссавців" (Патент України № 36006 від 12 жовтня 1999 р.; розробники Кассіч Ю. Я., Завгородній А. І., Кассіч В. Ю. з співав.) та матеріали ДСТУ 4664:2006: «Туберкулін очищений для ссавців у стандартному розчині», що передбачають використання для сенсibilізації тварин як патогенного збудника туберкульозу бичачого виду, так і живого 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.

В основу нашої роботи була поставлена задача розробити специфічний та екологічно безпечний спосіб визначення активності ППД-туберкуліну для ссавців очищеного в дослідках на морських свинках і великій рогатій худобі з використанням інактивованої автоклавуванням бактеріальної маси *M. bovis* штаму *Vallee*.

На підставі проведених експериментів на мурчаках та здоровій великій рогатій худобі, сенсibilізованих інактивованою культурою *M. bovis* *Vallee*, та щеплених культурою БЦЖ за методикою ДСТУ 4664:2006: «Туберкулін очищений для ссавців у стандартному розчині» 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 і придатними для алергічного дослідження тварин на туберкульоз.

Доведено, що способи визначення активності туберкуліну на

сенсibilізований інактивованою культурою *M. bovis Vallee* великій рогатій худобі та мурчаках та на щеплених вакцинним штамом БЦЖ тваринах є однаково ефективними. Обидва способи можуть використовуватись для проведення контролю активності ППД-туберкуліну для ссавців.

Таким чином, розроблений спосіб контролю активності туберкуліну на тваринах, щеплених інактивованою бактеріальною масою *M. bovis Vallee* є ефективним, активним та специфічним, а до того ж безпечним для здоров'я тварин і людей і запобігає розповсюдженню живих мікобактерій в природі.

У червні 2015 року та червні 2016 року Херсонським державним підприємством – біологічна фабрика виготовлені дослідно-виробничі серії № 1 (Е) та № 2 (Е), ППД-туберкуліну для ссавців очищеного з використанням розроблених та впроваджених технологічних методів і виробничих штамів та проведений заключний контроль їх якості. Активність випробовуваних серій туберкуліну в міжнародних одиницях (МО) визначали порівнянням їх з контрольними серіями туберкуліну на сенсibilізованих *M. bovis* штамів *Vallee* та (або) БЦЖ морських свинках. За результатами контролю виготовлені серії препарату визнані нешкідливими, ареактогенними та специфічними. Активність випробовуваних експериментальних серій туберкуліну № 1 та № 2 становить 49000 МО/мг та 47000 МО/мг, відповідно.

Таким чином, за результатами контролю, виготовлені із виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ за технологією з використанням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування Херсонським державним підприємством – біологічна фабрика експериментальні Серія № 1 (Е) та Серія № 2 (Е) «ППД-туберкуліну для ссавців очищеного» відповідають вимогам ДСТУ 4664:2006 та Директиви Ради ЄС 97/12 від 17.03.1997 р., придатні до використання і проведення державних випробувань.

Для дезінфекції виробничих приміщень, в яких проводились роботи з живим патогенним збудником туберкульозу бичачого виду штамів *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9 та *M. bovis Vallee* КМІЕВ-9КМ («брудної зони»), застосовували препарат «Бровадез-плюс», ефективність якого доведена нами

в дослідях, проведених на тест-об'єктах та в неблагополучних щодо туберкульозу ВРХ господарствах. Засіб являє собою сукупність синергічних композицій, що містять четвертинні амонійні сполуки [105].

Таким чином, в роботі теоретично та експериментально обґрунтовано, показано та узагальнено результати дослідження з розробки, впровадження та гармонізації з вимогами ЄС алергену «ППД-туберкулін для ссавців очищений» для алергічної діагностики туберкульозу тварин. Експериментальним шляхом відібрані та впроваджені у виробництво виробничі штами і технологічні прийоми виготовлення та контролю препарату. За результатами експериментальних досліджень в порівнянні з контрольними серіями доведено високу протейногенність виробничих штамів та діагностичну активність і специфічність дослідно-виробничих серій препарату. Основні наукові результати розділу опубліковані в працях автора [361-378], Додаток А.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі викладено теоретичне та експериментальне обґрунтування, узагальнені результати дослідження щодо розробки, впровадження та гармонізації з вимогами 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 в порівнянні 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 виявились високопротеїногенними, відповідають вимогам Директиви Ради ЄС 97/12 (від 17 березня 1997 р.) і використані 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 ($p < 0,05$) і становить $(1,20 \pm 0,2)$ 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 флакону на $(6,0)$ мг і дає можливість відповідно прискорити технологічний процес та збільшити вихід туберкуліну до $(1,20 \pm 0,1)$ 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 при виготовленні туберкуліну», які забезпечують інтенсивний ріст та накопичення бактеріальної маси *M. bovis*.

На середовищі Сотона КФ, у порівнянні з середовищем Сотона за класичним прописом появу первинного росту культури виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЕВ спостерігали на (3,0) доби раніше; суцільного росту (мікробної плівки) – на 6,0 діб 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 $(0,6)$ мг/см³. Препарат виходить стерильним та високоочищеним.

5. Після мікрофільтрації на ультрафільтраційних мембранних фільтрах *Sartoclean*[®]СА з діаметром пор 0,2-0,45 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 щепленій 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/см³ та 47000 МО/см³, 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 Die rhoude rijen Diergen zondheid (ID-DLO), Lelistad, The Netheriands* 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 № № 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 ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Агеев Е. П. Мембранные процессы разделения. / Е. П. Агеев // Крит. технол. Мембраны, 2001. – № 9. – С. 42–56.
2. Акимова Г. М. Профилактика туберкулеза // Новые задачи современной медицины: материалы III Междунар. науч. конф. (г. Санкт-Петербург, декабрь 2014 г.). — СПб.: Заневская площадь, 2014. — С. 34–37.
3. Алексеева Т. В. Тенденции эпидемиологической ситуации по туберкулёзу в территориях Сибирского федерального округа / Т. В. Алексеева, Г. С. Мурашкина // «90 лет – Красноярскому краевому противотуберкулёзному диспансеру», 2013. – Сборник статей. – № 1: Красноярск. – С. 33–35.
4. Алексеева Т. В. Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в территориях Дальневосточного федерального округа (2005-2014 годы) / Т. В. Алексеева // «Новые приоритеты в противотуберкулезной работе в циркумполярных регионах Арктики»: Материалы симпозиума с международным участием, 2015 . – Якутск. – С 8–11.
5. Александров Н. М. Дифференциальная диагностика туберкулеза маралов / Н. М. Александров, Р. И. Ситников, А. А. Иванов, Т. Х. Фаизов // Ученые записи Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. – Сельское и лесное хозяйство, 2013. – № 216. – С. 45–47.
6. Альховик О. И. Обнаружение нетуберкулёзных микобактерий в Сибирском регионе / О. И. Альховик, Л. С. Евдокимова, А. Г. Чередниченко, Т. И. Петренко // «Тырылгин М.А. Жизнь и деятельность. Воспоминания»: Материалы юбилейной научно-практической конференции «Актуальные вопросы организации противотуберкулёзной помощи в современных социально-эпидемиологических условиях», 2013. – Якутск. – С. 37 – 38.
7. Аналіз індикаторів епідеміологічної ситуації щодо захворюваності

на туберкульоз у Харківській області / Шевченко О. С., Овчаренко І. А., Китаєнко З. А., Ковальова Т. Ф. // Епідеміологічні дослідження в клінічній та профілактичній медицині: досягнення та перспективи, 2015. — матеріали наук.- практ. конф. з міжнар. участю, (12-13 берез., 2015 р., Харків, Україна), присвяч. 210-й річниці Харків. нац. мед. ун-ту та 85-річчю каф. епідеміології. С. 273–275.

8. Аникиев В. В. с соавт., 1977 по книге: Радчук И. А., Дунаев Г. В., Колычев Н. М. Ветеринарная микробиология и иммунология. М., ВО "Агропромиздат", 1991. — С. 284–294.

9. Атамась В. Я. Сучасні проблеми епізоотології / Аграрний вісник Причорномор'я. — збірник наукових праць, 2008. — Випуск 42. — Частина 2. — С. 4–7.

10. Бадукшанова Н. М. Антигены микобактерий и их диагностическая ценность / Бадукшанова Н. М., Воробьев А. А. // ЖМЭИ, 1991. — № 5. — С. 54–59.

11. Баратов М. О. К вопросу о детальной классификации коринебактерий / М. О. Баратов, О. П. Сакидибиров, М. М. Ахмедов, Н. А. Алиев // Научно-практ. журнал «Проблемы развития АПК региона». — Махачкала. — 2010. — № 4. — С. 72–76.

12. Баратов М. О. Комплексный аллерген для дифференциации аллергических реакций на ППД-туберкулин для млекопитающих / М. О. Баратов, М. М. Ахмедов, С. Ш. Кабардиев, А. Д. Алиев // Патент № 2409387 Гос. реестр изобретений РФ. — 20 января — 2011.

13. Баратов М. О. Динамика аллергических реакций на туберкулин у зараженных коринебактериями животных / М. О. Баратов, М. М. Ахмедов, О. П. Сакидибиров // Ветеринарный врач. — №2. — Казань, 2015. — С. 32–36.

14. Баратов М. О. Особенности туберкулеза крупного рогатого скота в республике Дагестан (эпизоотология, диагностика, дифференциальная диагностика и меры борьбы) : автореф. дис. ... докт. вет. наук : 06.02.02 — ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с

микотоксикологией и иммунология / М. О. Баратов. – Махачкала. – 2017. – 202 с.

15. Батыршина Я. Р. Клинико-эпидемиологические аспекты формирования лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам / Я. Р. Батыршина : автореф. дис. ...канд. мед. наук: 14.01.16 – фтизиатрия. – Новосибирск, 2015. – 22с.

16. Безгин В. М. Совершенствование промышленной технологии (ППД) туберкулина и его биохимическая характеристика / В. М. Безгин: дис. ...канд. биол. наук. : 05.00.00. – М., 1990. – 134 с.

17. Безгин В. М. Мембранное фракционирование биомолекул при промышленном изготовлении биопрепаратов / В. М. Безгин, В. Е. Козлов // Вестник курской государственной сельскохозяйственной академии. – Вып. № 9. – 2012. – С. 101–105.

18. Безгина Н. В. Изготовление туберкулина ППД для птиц в стандартном разведении с применением методов мембранной технологии / Безгина Н. В., Ничвеева Л. Д., Суханов В. П., Козлов В. Е. // Материалы международной юбилейной научно-практической конференции, посвященной 110-летию Курской биофабрики и агробиологической промышленности России, 21–22 сентября 2006 г – Курск – 2006 – С 98–100

19. Безгина Н. В. Оценка стабильности туберкулина ППД для птиц в стандартном разведении / Безгина Н. В. // Ветеринария — 2007 — № 8 — С. 6–9.

20. Безгина Н. В. Применение методов мембранного фракционирования для повышения качественных показателей аллергенов применяемых при диагностике туберкулеза / Безгина Н. В. // Ветеринарная патология — 2008 – № 1 – С. 15–17.

21. Безгина Н. В. Совершенствование методов изготовления и контроля туберкулина очищенного (ППД) для птиц : автореф. дис. ...канд. вет. наук : 16.00.03 / Безгина Наталья Вячеславовна; ФГОУ ВПО «Курская

государственная сельскохозяйственная академия имени профессора И. И. Иванова» и на ФГУП «Курская биофабрика». – Щелково, 2008. – 21 с.

22. Білушко В. В. Отримання очищених туберкулінів для алергічної діагностики туберкульозу тварин / В. В. Білушко, І. М. Дегтярьов // Вісник Сумського нац. аграр. ун-ту. Серія «Вет.медицина» : наук.-метод. журн., 2006. – Вип. 1-2 (15–16). – С. 19–22.

23. Білушко В. В. Порівняльне вивчення властивостей туберкулінів для ссавців, виготовлених за різними технологіями /В. В. Білушко, І. М. Дегтярьов // Пробл. зооінженерії та вет. медицини: зб. наук, праць Харювської держ. Зооветеринарної акад. — Х., 2006. — Вип. 13, ч. 2: Матеріали міжнарод. наук. конф. «Актуальные вопросы борьбы с инфекционными заболеваниями в гуманной и ветеринарной медицине», посвящ. 160-летию со дня рождения лауреата Нобелевской премии И. И. Мечникова (27-30 нояб. 2005 г.). — С. 51–55.

24. Білушко В. В. Біобезпека та якість сухого очищеного туберкуліну (ППД) для ссавців / В. В. Білушко // Ветеринарна медицина № 94, 2010. – С. 111–113.

25. Білушко В. В. Дослідження біологічної активності туберкуліну сухого очищеного (ППД) для ссавців / В. В. Білушко // Ветеринарна медицина. – Вип.95, 2011. – С. 198–199.

26. Білушко В. В. Випробування туберкуліну сухого очищеного (ППД) для ссавців у порівнянні з закордонним аналогом «*Bovituberculin AN5*» (*Puławy*) *in vivo* / Віктор Валерійович Білушко // Ветеринарна медицина № 96, 2012. – С. 146–148.

27. Белушко В. В. Оценка качества туберкулина с применением программных систем / В. В. Белушко, А. И Завгородний, Е. В. Белушко. – Ветеринарна медицина № 100, 2015. – С. 198–200.

28. Березовський І. В. Виявлення мікобактерій туберкульозу різними методами / І. В. Березовський // Науковий вісник Львівського нац. ун-ту вет. медицини ім. С. З. Гжицького. – Львів, 2005. – Т.7.— ч. 1. – С. 8–11.

29. Благодатний В. М. Система якості мікробіологічної діагностики туберкульозу / В. М. Благодатний, Н. Б. Гончаренко, А. Г. Салманов // Вип. 23, кн. 4 // Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика / Нац. мед. акад. післядиплом. освіти ім. П. Л. Шупика. — Київ, 2014. — Вип. 23, кн. 4. — С. 46–53.

30. Бусол В. Епізоотичний моніторинг; Туберкульоз / В. Бусол, В. Постой, В. Ситник // Ветеринарна медицина України, 2002, № 1.— С. 8–10.

31. Бусол В. О. Моніторинг епізоотичної ситуації з туберкульозу великої рогатої худоби в країнах світу / В. О. Бусол, В. П. Постой, В. А. Ситник // Наук.вісник Національного аграр.ун-ту, 2001, Вип.42.— С. 146–152.

32. Бушмелева П. В. Новые экспериментальные модели для биологической пробы при диагностике туберкулеза сельскохозяйственных животных : автореф. дис. канд. вет. наук : 06.02.02 / Бушмелева П. В.; РАСХН. – Новосибирск, 2011. – 19 с.

33. Власенко О. Л. Епізоотологічна ситуація по туберкульозу великої рогатої худоби в Сумській області / О. Л. Власенко, М. Д. Камбур, В. Ю. Кассіч, Л. П. Лівощенко, Є. М. Лівощенко, І. В. Задорожній, Г. О. Приходько // Вісник СНАУ. – Серія «Вет. мед.», 2009. – Вип. 6(25). – С.40–44.

34. Говоров А. М. Получение и производственное испытание сухого туберкулопротеина / А. М. Говоров, Ф. И. Осташко // Научные труды УИЭВ, 1956. – Т. 23. –С. 101–111.

35. Головка А. М. Розвиток ветеринарно-біологічної промисловості / А. М. Головка, В. О. Ушкалов // Здоров'я тварин та ліки, 2013. – №12 (145). – С. 8–11.

36. Головка В. О. Вивчення властивостей виробничого штаму *M. BOVIS* «*VALLE*» КМІЕВ-9КМ / В. О. Головка, О. В. Кассіч., В. Ю. Кассіч,

К. Ю. Колеснікова, В. Г. Кошельник // Вісник СНАУ серія «Вет мед», 2015. — Вип. № 1 (36). — С. 106–109.

37. Головка В. О. Продукція туберкулопротейнів виробничим штамом *M. BOVIS «VALLEE»* КМІЕВ-9К / В. О. Головка, О. В. Кассіч, В. Ю. Кассіч, К. Ю. Колеснікова, В. Г. Кошельник / Вісник СНАУ серія «Вет. мед», 2015. — Вип. № 7 (37). — С. 108–111.

38. Горжеев В. М. Перспективи оздоровлення неблагополучних господарств України від туберкульозу великої рогатої худоби / Володимир Горжеев // Ветеринарна медицина України, 2003.— № 5.— С.18–19.

39. Горжеев В. М. Здобутки в боротьбі з туберкульозом великої рогатої худоби в господарствах України / В. М. Горжеев, Ю. Я. Кассіч, А. І. Завгородній, М. С. Павленко, В. Ю. Кассіч // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб. — Х., 2004. — Вып.84. — С. 268–271.

40. Горжеев В. М. Епізоотичний моніторинг та удосконалення системи боротьби з туберкульозом великої рогатої худоби в господарствах України : автореф. дис. ...канд. вет. наук: спец. 16.00.08 «Ветеринарна епізоотологія та інфекційні хвороби» / Горжеев Володимир Михайлович — Харків, 2005. — 20 с.

41. Горжеев В. Епізоотична ситуація в світі та її вплив на протиепізоотичні заходи в Україні // Здоров'я тварин та ліки, 2013. — №12 (145). — С. 8–11.

42. Гринев А. А. Изыскание промышленного способа изготовления сухого очищенного туберкулина (ППД) для птиц : дис. ... канд. вет. наук./ Гринев А. А.: Воронеж, 1973.— 24с.

43. Горячий Н. В., Свитцов А. А. Использование мембранной технологии в производстве пектина // Крит. технол. Мембраны, 2006. — № 1. — С. 34–37.

44. Гулюкин М. И. Координация научно-исследовательских работ по проблеме туберкулеза крупного рогатого скота / М. И. Гулюкин // Ветеринарная патология, 2004. — Т 1-2 (9). — С. 13–18.

45. Гулюкин М. И. Методические наставления по проведению исследований при микобактериозах животных / М. И. Гулюкин, А. Х. Найманов, Н. П. Овдиенко, В. А. Ведерников: Москва, 2012. – 85с.

46. Гулюкин М. И. Оздоровительные мероприятия при туберкулезе крупного рогатого скота / М. И. Гулюкин, А. Х. Найманов, В. А. Ведерников [и др.] // Вереринария, 2012. – № 1. – С.

47. Добрелин В. И. Эпизоотологический мониторинг туберкулеза крупного рогатого скота в Ростовской области и совершенствование мероприятий по профилактике : автореф. дис. ...канд. вет. наук : 16.00.03 / В. И. Добрелин ; РАСХН. – Новочеркасск, 2009. – 21 с.

48. Донченко А. С. Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота / А. С. Донченко, Н. П. Овдиенко, Н. А. Донченко. – Новосибирск, 2004. – 309 с.

49. Донченко А. С. Изготовление моновидовых аллергенов (МА): А. С. Донченко, Н. П. Овдиенко, Н. А. Донченко по «Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота». – Новосибирск, 2004. – 309 с.

50. Донченко А. С. Научные и практические основы профилактики и ликвидации туберкулеза крупного рогатого скота / А. С. Донченко, Н. А. Донченко // Сиб. вестн. с.-х. науки, 2004. – № 3. – С. 81–88

51. Донченко Н. А. Усовершенствование средств и методов диагностики и профилактики туберкулеза крупного рогатого скота : автореф. ...дис. д-ра. вет. наук : 16.00.03, 16.00.04 / Н. А. Донченко ; РАСХН. – Новосибирск, 2008. – 41 с.

52. Дегтярьов І. М. Випробування експериментального туберкуліну для ссавців / І. М. Дегтярьов // Наук. вісник Львівської нац. акад. вет. медицини ім. С. З. Гжицького. – Львів, 2006. – Т.8, №3 (30), ч.1. – С.27–30.

53. Дегтярьов І. М. Вивчення протейногенних властивостей культур *M. bovis* та удосконалення способу виготовлення туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців : автореф. дис. ...канд. вет. наук: 16.00.03. – Харків, 2009. – 21 с.

54. Дубяга В. П. Нанотехнологии и мембраны / Дубяга В. П., Бесфамильный И. Б. // Крит. технол. Мембраны, 2005. – № 3. – С. 11–16.
55. Дымова М. А. Генотипирование изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, характеризующихся широкой лекарственной устойчивостью / М. А. Дымова, А. Г. Чередниченко, О. И. Альховик, Е. А. Храпов, Т. И. Петренко // «Фундаментальные науки – медицине»: Сборник тезисов. – Новосибирск, 2013. – С.51.
56. Дымова М. А. Молекулярно-генетическая характеристика лекарственно-устойчивых изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории Сибири / М. А. Дымова, О. И. Альховик, А. Г. Чередниченко, Е. А. Храпов, Т. И. Петренко, М. Л. Филипенко // Проблемы медицинской микологии, 2015. – Т.17. – №2. – С.67–68.
57. Завгородній А. І. Оцінка ефективності експериментальних мікроскрій туберкуліну для ссавців / А. І. Завгородній, В. В. Білушко, І. М. Дегтярьов // Зб. Наук .праць Полтавської держ. аграр. Акад., 2006. – С. 110–115.
58. Завгородній А. І. ППД-туберкулін для ссавців виробництва Сумської біофабрики / А. І. Завгородній, П. М. Тихонов, В. В. Білушко, І. М. Дегтярьов, В. Г. Скрипник // «Ветеринарна медицина України». – 2006. – № 2. – С. 34–35.
59. Завгородній А. І. Діагностична ефективність туберкулінів, що виготовлені за різними технологіями / А. І. Завгородній, В. В. Білушко, І. М. Дегтярьов // Зб. Наук. праць Луганського нац. аграр. ун-ту. – Луганськ, 2006. – № 69 (92). – С. 164–168.
60. Завгородній А. І. Виготовлення туберкуліну для ссавців із дезінтегрованої бактеріальної маси мікобактерій / А. І. Завгородній, В. В. Білушко, І. М. Дегтярьов // Зб. наук. праць Луганського нац. аграр. ун-ту. – Луганськ, 2007. – №78 (101). – С. 218–222.
61. Завгородній А. І. Пошук протейногенних штамів мікобактерій *M. bovis* для виготовлення туберкуліну (ППД) для ссавців / А. І. Завгородній,

П. М. Тихонов, В. В. Білушко, І. М. Дегтярьов, С. А. Позмогова / Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2008. – Вип. 89. – С. 184–189.

62. Завгородній А. І. Роль мікобактерій в розвитку захворювань риб / А. І. Завгородній, О. В. Шаповалов, С. А. Позмогова // Ветеринарна медицина, 2009. – Вип. 92., – С. 197 – 202.

63. Завгородній, А. І. Бактерицидні властивості деззасобу ДЗПТ-2 щодо мікобактерій / А. І. Завгородній, Б. Т. Стегній, А. П. Палій, В. М. Горжеєв // Ветеринарна медицина України. – 2010. – №2. – С. 27–30.

64. Завгородній А. І. Деякі аспекти профілактики туберкульозу сільськогосподарських тварин / А. І. Завгородній, Б. Т. Стегній, А. П. Палій, В. М. Горжеєв // Ветеринарна медицина України, 2010. – №2. – С. 7–11.

65. Завгородній А. І. Ризик та поширення паратуберкульозу в Україні / А. І. Завгородній, С. А. Позмогова, В. М. Горжеєв // Ветеринарна медицина України. – 2011. – №2. – С. 4–5.

66. Завгородній А. І. Порівняльне вивчення бактерицидних властивостей вітчизняних та закордонних дезінфектантів щодо мікобактерій / А. І. Завгородній, Б. Т. Стегній, А. П. Палій, В. М. Горжеєв // Ветеринарна медицина України. – 2012. – № 4. – С. 6–9.

67. Завгородній А. І. Ефективність дезінфекції залежно від якості проведення механічного очищення / А. І. Завгородній, А. П. Палій, М. В. Калашник // Ветеринарна медицина України. – 2012. – № 5. – С. 8–10.

68. Завгородній А. І. Значення дезінфекції у системі профілактики туберкульозу / А. І. Завгородній, А. П. Палій // Вісник аграрної науки. – 2012. – № 8. – С. 41–44.

69. Завгородній А. І. Вплив ліофілізації на збереження активності та специфічності туберкуліну для ссавців / А. І. Завгородній, В. В. Білушко, В. С. Баранов // Ветеринарна медицина № 97, 2013. – С. 521–523.

70. Завгородній А. І. Наукове забезпечення протитуберкульозних заходів в Україні / А. І. Завгородній // Ветеринарна медицина України, 2013. – № 10. – С. 15-16.

71. Завгородній А. І. Порівняльне вивчення активності туберкулінів / А. І. Завгородній, Б. Т. Стегній, В. В. Білушко // Ветеринарна медицина № 98, 2014. – С. 47–49.
72. Завгородній А. І. Система епізоотологічного моніторингу, діагностики, профілактики та оздоровлення тваринництва України від туберкульозу / А. І. Завгородній, Б. Т. Стегній, І. Ю. Бісюк, В. М. Горжеєв, А. П. Герілович, А. П. Палій, С. А. Позмогова, С. В. Комісаренко, П. П. Достоевський // Ветеринарна медицина України, 2014. – № 1. – С. 10–13.
73. Завгородній А. І. Біологічні властивості L-форм мікобактерій, виділених з патматеріалу / А. І. Завгородній, А. П. Палій, Б. Т. Стегній, В. М. Калашник // Ветеринарна медицина України, 2014. – № 11. – С. 9–12.
74. Завгородній А. І. Вивчення культурально-морфологічних і біологічних властивостей атипичних мікобактерій, виділених від великої рогатої худоби в господарствах України / А. І. Завгородній, О. В. Котляр // Ветеринарна медицина, 2014. – Випуск 98. – Розділ 6. – С. 124–127.
75. Патент на корисну модель № 25807. Україна МПК (2006) C12N 1/20. Туберкуліногенний штам *M. bovis* № 4 / А. І. Завгородній, Б. Т. Стегній, В. В. Білушко, С. А. Позмогова, І. М. Дегтярьов, Удовенко Я. С.; заявник та патентовласник Нац. наук. центр «Ін-т експерим. і клін. вет. медицини, м. Харків». – № u 200703311 ; заявл. 27.03.07; опубл. 27.08.07, Бюл. № 13. – 4 с.
76. Загаба Л. М. Порівняльний аналіз частоти виявлення і особливостей локалізації мікобактерій туберкульозу у фазу прогресування фіброзно-кавернозного туберкульозу та туберкульом легень / Загаба Л. М., Кузовкова С. Д., Ліскіна І. В. // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика». — 6–7 лют. 2015 р., м. Одеса // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика». — Одеса, 2015. — С. 187–190.

77. Закон України «Про протидію захворюванню на туберкульоз» : за станом на 01 серп. 2012 р / Верховна Рада України. — Офіц. вид. — Київ : Парлам. вид-во, 2012. — 17, [1] с.

78. Закон України "Про здійснення державних закупівель" від 10.04.2014.

79. Закон України №4851-VI "Про особливості здійснення закупівель в окремих сферах господарської діяльності" від 24.05.2012.

80. Закон України №3659-XII "Про Антимонопольний комітет України" від 26.11.1993.

81. Зелінський М. Туберкульоз великої рогатої худоби. Причини виникнення та фактори, що стримують оздоровлення неблагополучних господарств / Микола Зелінський // Ветеринарна медицина України, 2000. — № 6.— С. 15-16.

82. Епідемічна ситуація з туберкульозу і коінфекції ТБ/ВІЛ у Харківській області та заходи протидії їх поширенню : ситуац. аналіз / [Б. О. Волос та ін.] ; Упр. охорони здоров'я Харк. облдержадмін [та ін.]. — Київ : Вид-во Раєвського, 2008. — 52 с.

83. Епідемічна ситуація з туберкульозу і коінфекції ТБ/ВІЛ у Дніпропетровській області та заходи протидії їх поширенню : ситуац. аналіз / [Д. Г. Крижанівський та ін.] ; Голов. упр. охорони здоров'я Дніпропетр. облдержадмін., Дніпропетр. обл. комун. клін. лікув.-профілакт. об'єднання "Фтизіатрія", Комун. закл. Дніпропетр. обл. інформ.-аналіт. центр мед. статистики. — Київ : Вид-во Раєвського, 2008. — 64 с.

84. Емельянов И. В. Сравнительная характеристика микобактерий туберкулеза маралов и крупного рогатого скота, схема дифференциации туберкулиновых реакций : автореф. дис. ...канд. вет. наук : 06.02.02 / Емельянов И. В. ; РАСХН. — Барнаул, 2005. — 21 с.

85. Івченко В. Туберкульоз великої рогатої худоби / В. Івченко // Пропозиція, 2013. — № 2. — С. 140-145.

86. Ежова А. Ю. Использование мембранной технологии для концентрирования и очистки ферментных растворов пектинлиазы / А. Ю. Ежова, Э. А. Шишкова, Г. Б. Бравова, Е. А. Нестеренко // Биотехнология, 2001. – № 5. — С. 45-50.

87. Ларина Л. Н. Использование мембранной технологии для концентрирования и очистки ксиланазы *Trichoderma viride* и некоторые свойства ферментного препарата / Л. Н. Ларина, Н. М. Павлова, Э. А. Шишкова и др. // Биотехнология, 2005. – № 4. – С. 38–46.

88. Калашник М. Д. Дослідження патологічного матеріалу від лабораторних тварин на туберкульоз / М. Д. Калашник // Вісн. Сум. нац. аграр. ун-ту. Сер.: Вет. медицина. –2016. – Вип. 6 (38). С. 137–141.

89. Калашник М. Д. Дослідження біологічного матеріалу від великої рогатої худоби культуральним методом на туберкульоз / М. Д. Калашник // Вет. медицина: міжвідом. темат. наук. зб. Харків, 2016. – Вип. 102. – С. 91–94.

90. Калашник М. Д. Епізоотологічний моніторинг та удосконалення лабораторної діагностики туберкульозу великої рогатої худоби : автореф. дис. ... канд. вет. наук. / М. Д. Калашник . – Харків. – 2017. – 22 с.

91. Калмыкова М. С. Диагностическая ценность ПЦР-тест-системы при туберкулезе животных : автореф. дис. ...канд. вет. наук : 16.00.03 / М. С. Калмыкова ; РАСХН. – Москва, 2007. – 19 с.

92. Калмыков В. М. Использование полимеразой цепной реакции в целях мониторинга благополучия по микобактериальным инфекциям зоопарковых, цирковых и сельскохозяйственных животных : автореф. дис. ...канд. вет. наук : 06.02.02 / В. М. Калмыков ; РАСХН. – Щелково, 2013. – 21 с.

93. Кандыбина Т. В. Патоморфология экспериментального туберкулеза у белых крыс : автореф. дис. ...канд. вет. наук : 06.02.02 / Т. В. Кандыбина ; РАСХН. – Благовещенск, 2011. – 21 с.

94. Кассіч В. Ю. Мікобактерії та їх диференціація / В. Ю. Кассіч // Вісник Сумського НАУ. Серія «Ветеринарна медицина», 2013. – Випуск 2 (32). – С. 106-109.

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

96. Кассіч В. Ю. Проблеми сучасної епізоотології / В. Ю. Кассіч, М. Д. Камбур, А. І. Фотін, Г. І. Ребенко, Ю. А. Байдевятов, О. В. Волосянко, В. О. Ушкалов, В. Я. Атамась, О. В. Фотін // Ветеринарна медицина. Вісник Сумського національного аграрного університету. – Суми, 2014, №1 (34). – С. 110–114.

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

98. Кассич В. Ю. Влияние социально-экономических и экологических факторов на эпизоотическую ситуацию по туберкулезу / В. Ю. Кассич, Ю. Я. Кассич, Н. П. Овдиенко // Актуальные проблемы ветеринарной патологии и морфологии животных: Матер. междунар.науч.-производ.конф., посвященной 100-летию со дня рождения профессора Авророва А. А., 22-23 июня 2006г., г. Воронеж. – Воронеж, 2006. – С. 296–305.

99. Кассіч В. Ю. Влияние повышенного радиационного фона и социально-экономических факторов на эпизоотическую ситуацию по туберкулезу животных / В. Ю. Кассіч, Ю. Я. Кассіч // Наук.-теор. зб. Вісник Державного навчального закладу «Державний агроєкологічний університет», 2007.– Вип. № 2 (19), т.1. – Житомир. — С. 106 –111.

100. Кассіч В. Ю. Розроблення та впровадження у виробництво алергенів для діагностики туберкульозу ссавців та птиці / В. Ю.Кассіч // Вісник СНАУ. Серія «Вет. мед.», 2008. – Вип. 9/2 (22), – С. 30–33.

101. Кассіч В. Ю. Розробка та впровадження у виробництво туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців у стандартному розчині / В. Ю. Кассіч, Ю. Я. Кассіч // Зб. наук. праць Луганського національного аграрного університету. – Луганськ, 2007. – Вип. № 78/101. – С. 278–282.

102. Кассіч В. Ю. Розробка технології промислового виготовлення алергену з атипових мікобактерій (ААМ) / В. Ю. Кассіч, Ю. Я. Кассіч // Вісник Сумського НАУ, 2007. – Вип. 2 (18). – С. 66–69.

103. Кассіч В. Ю. Розробка та впровадження у виробництво алергенів для діагностики туберкульозу ссавців та птиці / В. Ю. Кассіч, Ю. Я. Кассіч // Вісник Сумського НАУ, 2008. – Вип. 9/2 (22). – С. 30–32.

104. Кассіч В. Ю. Експериментальне випробування дезінфектанту бровадез-плюс щодо збудників туберкульозу / Т. Фотіна, Г. Фотіна, В. Дзюба // Ветеринарна медицина України, 2008. – №3. – С. 39–40.

105. Кассіч В. Ю. Дезінфекція виробничих приміщень неблагополучних щодо туберкульозу господарств з використанням препарату «Бровадез-Плюс» / В. Ю. Кассіч, Т. І. Фотіна, А. В. Березовський, Г. А. Фотіна, М. Д. Камбур, О. В. Кассіч, І. П. Полоз, О. Л. Власенко // Вісник СНАУ. – Серія «Ветеринарна медицина», 2010. – Вип. 8(27). – С. 42–44.

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

107. Кассіч В. Ю. Моніторинг епізоотичної ситуації щодо туберкульозу великої рогатої худоби у зоні радіоактивного забруднення / В. Ю. Кассіч, Б. Т. Стегній // Тези доп. Міжнар. наук.-прак.конф. «Епізоотологія і профілактика інфекційних хвороб великої рогатої худоби» 14 -17 березня 2006 року. – Київ, 2006. – НАУ. – С. 38.

108. Кассіч В. Ю. Туберкульоз сьогодні / Ветеринарна медицина Сумщини. Газета Асоціації спеціалістів ветеринарної медицини Сумщини від 17 червня 2008 р. Присвячена Всеукраїнському семінару «Профілактика і

методи боротьби з туберкульозом великої рогатої худоби», Суми, 18–20 червня 2008 року. – № 2. – С.1.

109. Кассич В. Ю. Аллергия и аллергическая диагностика инфекционных болезней / В. Ю. Кассич, Н. П. Овдиенко, О. В. Волосянко, Т. Г. Нестеренко // Зб. статей міжнародної наук.- прак. конф. «Сучасні проблеми біотехнології, стандартизації та забезпечення контролю якості вет. препаратів, кормів та кормових добавок», присвячена 10-річчю ДНКІБШМ. // Вет. біотехнологія, 2008. – Бюл. №13 (2). – Київ. – С.123–128.

110. Кассич В. Ю. Імунологічні та гістоморфологічні дослідження хворих на туберкульоз опромінених тварин / В. Ю. Кассич, О. В. Волосянко, М. Д. Камбур // Вісник СНАУ. – Серія «Вет. мед.», 2010. – Вип. 3(26). – С. 5–68.

111. Кассич В. Ю. Аналіз рівня радіоактивного забруднення території України / В. Ю. Кассич, М. Д. Камбур, О. В. Волосянко // Вісник СНАУ. – Серія «Вет.мед.», 2009. – Вип.6(25). – С. 60–63.

112. Кассич В. Ю. Дифференциальная диагностика псевдоаллергических реакций на туберкулин / В. Ю. Кассич, Т. И. Фотина, А. А. Фотина, О. В. Волосянко, Н. П. Овдиенко // Сб. статей Междунар. науч.-практ. конф. «Инновационное развитие аграрного сектора экономики: взгляд молодых ученых» (г. Курск, 9-11 декабря 2009 года). – Курск: Изд-во Курск. гос. с.-х. ак., 2010. – (278с.). – С.161–164.

113. Кассич В. Ю. Мониторинг туберкулеза и других зоонозов на Украине (1976-2009 гг.) / В. Ю. Кассич, Ю. Я. Кассич, Т. И. Фотина, А. А. Фотина, О. В. Волосянко, Н. П. Овдиенко // Сб. статей Международной науч.-практ. конф. «Инновационное развитие аграрного сектора экономики...» (г. Курск, 9-11 декабря 2009 года). – Курск: Изд-во Курск. гос. с.-х. ак., 2010. – (278с.). – С. 179–188.

114. Кассич В. Ю. Мінливість мікобактерій, епізоотологічний моніторинг, заходи і засоби боротьби з туберкульозом тварин в умовах радіаційного впливу : автореф. дис. ... док. вет. наук : спец. 16.00.03

«Ветеринарна мікробіологія і вірусологія» / В. Ю. Кассіч. – Харків, 2004. – 42 с.

115. Кассіч В. Ю. Мінливість мікобактерій, епізоотологічний моніторинг, заходи і засоби боротьби з туберкульозом тварин в умовах радіаційного впливу : дис. ... док. вет. наук : спец. 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія і вірусологія» / В. Ю. Кассіч. – Харків, 2004. – 235 С.

116. Кассич В. Ю. Повышение диагностической эффективности питательных сред для культивирования микобактерий с использованием ростовых факторов / В. Ю. Кассіч, Ю. Я. Кассич, Т. И. Фотина, А. А. Фотина, О. В. Волосянко // Сб. статей Междунар. науч.-практ. конф. «Инновационное развитие аграрного сектора экономики: взгляд молодых ученых» (г. Курск, 9-11 декабря 2009 года). – Курск: Изд-во Курск. гос. с.-х. ак., 2010. – (278с.). – С. 211–216.

117. Кассіч В. Ю. Імунологічні та патоморфологічні дослідження хворих на туберкульоз опромінених тварин / В. Ю. Кассіч, О. В. Волосянко, М. Д. Камбур // Вісник СНАУ. – Серія «Вет.мед.», 2011. – Вип.2 (29). – С. 65–67.

118. Кассіч В. Ю. Мікобактеріози як паразитози та сапронози / В. Ю. Кассіч // Вісник аграрної науки, 2004. – № 11. – С. 35–38.

119. Кассіч В. Ю. Мікобактеріози як паразитози та сапронози / В. Ю. Кассіч // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2004. – Вып. 84. – С. 326–330.

120. Кассич В. Ю. Микобактериозы как паразитозы и сапронозы / В. Ю. Кассич // Ветеринарная патология. Научно-практический журнал по фундаментальным и прикладным вопросам ветеринарии. Современные проблемы диагностики и профилактики туберкулеза животных. – М., 2004. – № 1-2 (9). – С. 127–132.

121. Кассіч В. Ю. Імунологічна реактивність при туберкульозі в опромінених тварин / В. Ю. Кассіч // Ветеринарна медицина. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. – Харків, 2004. – Випуск 83. – С. 111–114.

122. Кассіч В. Ю. Вдосконалення лабораторної діагностики туберкульозу з використанням радіаційної техніки / В. Ю. Кассіч // Вісник Сумського ДАУ (науково-методичний журнал). – Суми, 2001. – Вип. 6. – С. 63–67.

123. Кассич В. Ю. Морфология и биологические свойства микобактерий в условиях радиационного воздействия / В. Ю. Кассіч, Н. П. Овдиенко // Науковий вісник Львівської Державної Академії ім. С. З. Гжицького. – Львів, 2001. – Том 3 (2). – С.110–119.

124. Кассіч В. Ю. Порівняльне вивчення методів визначення специфічної активності моноалергенів з мікобактерій при виробництві препаратів для алергічної діагностики туберкульозу / В. Ю. Кассіч // Ветеринарна медицина. Міжвідомчий тематичний зб., 2002. – Харків. — №80. – С. 278–284.

125. Кассіч В. Ю. Моніторинг виділення культур мікобактерій в Україні / В. Ю. Кассіч // Ветеринарна медицина України. Міжвідомчий тематичний наук. зб., 2003. – Харків. – № 82. – С. 265–268.

126. Кассич В. Ю. Микробиология туберкулеза в условиях воздействия ионизирующей радиации / В. Ю. Кассич, Н. П. Овдиенко. // Ветеринария, 2002. – №9. – С.11–14.

127. Кассич В. Ю. Мониторинг туберкулеза в зоне радиационного загрязнения / В. Ю. Кассич, Н. П. Овдиенко, В. Д. Сыпин // Ветеринария (М.), 2002. – №3. – С.5–10.

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

129. Кассіч Ю. Я. Застосування симультанної алергічної проби для визначення природи реакцій на туберкулін у поодиноких тварин великої рогатої худоби, благополучної щодо захворювання на туберкульоз / Ю. Кассіч, А. Завгородній, В. Льоля, С. Негипа, В. Горжеєв, О. Кучерявенко, П. Онищенко, В. Наумчук, В. Яковлев, В. Макаров, В. Рябуха, В. Кассіч // Вет. медицина України, 2003. – № 1. – С. 17–18.

130. Кассич Ю. Я. Симультанная аллергическая проба при диагностике туберкулеза / Ю. Я. Кассич, А. И. Завгородний, В. Ю. Кассич // Ветеринария, 2004. – № 8. – С.16–18.

131. Кассіч Ю. Визначення природи реакцій на туберкулін у великої рогатої худоби шляхом застосування симультанної алергічної проби / Ю. Кассіч, А. Завгородній, П. Вербицький, В. Горжеєв, О. Кучерявенко, В. Льоля, В. Яковлев, С. Негипа, В. Кассіч // Ветеринарна медицина України, 2001. – №5. – С.14–15.

132. Кассіч Ю. Повторний спалах туберкульозу в оздоровленої худоби – це рецидив чи реінфекція? Які ж причини його виникнення? / Ю. Кассіч, А. Завгородній, В. Горжеєв, В. Льоля, В. Кассіч // Ветеринарна медицина України, 2002. – №8. – С. 33–34.

133. Кассіч Ю. Епізоотологічне спостереження – засіб прогнозування епізоотичної ситуації, управління нею та вдосконалення заходів в боротьбі з туберкульозом / Ю. Кассіч, А. Завгородній, П. Вербицький, В. Горжеєв, О. Кучерявенко, М. Зелінський, М. Співак, Є. Різуненко, В. Льоля, М. Павленко, В. Кассіч // Ветеринарна медицина України, 2003. – №3. – С. 15–17.

134. Кассіч Ю. Я. Якої шкоди завдають мікобактерії тваринництву Харківщини? / Ю. Я. Кассіч, А. І. Завгородній, В. В. Льоля., О. І. Заїка, А. В. Гриненко, С. Д. Принцевський, В. Я. Яковлев, П. О. Шершень, В. Ю. Кассич // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. Зб. наук. праць присвячений 150-річчю від заснування ХЗВІ. – Харків, 2001. – Вип. 9 (33). Ч.1. – С. 73–78.

135. Кассич Ю. Я. Достижения науки и практики в борьбе с туберкулезом животных в хозяйствах Украины / Ю. Я. Кассіч, А. І. Завгородній, В. В. Льоля, В. Я. Яковлев, В. Ю. Кассич // Ветеринарная патология. Науч.-практ. журнал по фундаментальным и прикладным вопросам ветеринарии. Современные проблемы диагностики и профилактики туберкулеза животных.– М., 2004.–№ 1-2 (9).– С. 38–41.

136. Кассич Ю. Оздоровлення стад великої рогатої худоби, ураженої збудником туберкульозу та водночас сенсibiliзованої до туберкуліну непатогенними мікобактеріями / Ю. Кассич, А. Завгородній, В. Горжеєв, М. Павленко, П. Онищенко, В. Наумчук, М. Ігнатов // Ветеринарна медицина України. – 2004. – № 7. – С. 11–14.

137. Кассич Ю. Я. Високоєфективний вітчизняний туберкулін / Ю. Я. Кассич, А. І. Завгородній, П. М. Тихонов, В. М. Горжеєв, В. Ю. Кассич // Аграрна наука-виробництво. – 2005. – № 1. – С. 26–27.

138. Патент України № 36006. Заявл. 12.10.99. Опубл. 17.02.2003. Бюл. № 2.–2 с. / Спосіб контролю визначення активності туберкуліну (ППД) для ссавців // Ю. Я. Кассич, А. І. Завгородній, В. М. Горжеєв, В. В. Льоля, С. С. Негица, В. Ю. Кассич.

139. Деклараційний патент України № 49407 А. Заявл. 03.12.2001. Опубл. 16.09.2002. Бюл. № 9.–2 с. / Спосіб підтримки й перевірки протеїногенності та однорідності виробничих культур атипових мікобактерій для виробництва антигену з атипових мікобактерій (ААМ). // Кассич В. Ю., Кассич Ю. Я., Завгородній А. І.

140. Деклараційний патент України № 60447 А. Заявл. 02.08.2002; Опубл. 15.10.2003. Бюл. № 10.–2 с. / Спосіб виготовлення алергену з атипових мікобактерій (ААМ) // Кассич Ю. Я., Завгородній А. І., Шаров А. Н., Горжеєв В. М., Кассич В. Ю.

141. Деклараційний патент України № 51326А. Заявл. 22.02.2002. Опубл. 15.11.2002. Бюл. № 11.–2 с. / Туберкуліногенний штам із мікобактерій пташиного виду *M. AVIUM* IEKBM УААН для виготовлення туберкуліну очищеного *PURIFIED PROTEIN DERIVATIVE* (ППД) для птиці // Кассич Ю. Я., Завгородній А. І., Стегній Б. Т., Горжеєв В. М., Кассич В. Ю.

142. Деклараційний патент України № 57266 А. Заявл. 10.06.2002. Опубл. 16.06.2003. Бюл. № 6.–2 с. / Спосіб визначення активності туберкуліну очищеного (ППД) для птахів // Кассич Ю. Я., Завгородній А. І., Кассич В. Ю.

143. Деклараційний патент на корисну модель 63246 и за результатами формальної експертизи. Реєстр. № заявки и 2010 14606., 08.07.2011 // Синтетичне живильне середовище (Сотона КФ) для прискореного накопичення бактеріальної маси мікобактерій // Кассіч В. Ю., Фотіна Т. І., Фотіна Г. А., Дзюба В. М., Кассіч О. В., Полоз І. М.

144. Патент на корисну модель № 114777 Спосіб отримання туберкуліну з культуральної рідини та бактеріальної маси мікобактерій. Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 27.03.2017. Номер заявки и 201604892. Дата порання заявки 04.05.2016. Власники та винахідники Кассіч В. Ю., Кассіч О. В., Кошельник В. Г., Колеснікова К. Ю., Терпецька Т. О.

145. ТУУ 24.4.00497087.645-2001. Затверджені Головою Державного департаменту ветеринарної медицини України 19 грудня 2001 року. / Туберкулін очищений (ППД) для ссавців у стандартному розчині // Кассіч Ю. Я., Завгородній А. І., Горжеев В. М., Тіхонов П. М., Кассіч В. Ю., Доценко В. В.

146. ТУУ 24.4-00497087-697-2003. Затверджені Головою Державного департаменту ветеринарної медицини 29 липня 2003 року. / Алерген сухий очищений із атипових мікобактерій (ААМ) // Кассіч Ю. Я., Завгородній А. І., Горжеев В. М., Стегній Б. Т., Білушко В. В., Кассіч В. Ю.

147. ТУУ 24.4.00497087-698-2003. Затверджені Головою Державного департаменту ветеринарної медицини 29 липня 2003 року / Розчинник мікобактеріальних алергенів // Кассіч Ю. Я., Завгородній А. І., Горжеев В. М., Кассіч В. Ю.

148. ТУУ 24.4.00497087.356-2002. Затверджені Головою Державного департаменту ветеринарної медицини України 10 грудня 2002 року / Туберкулін очищений (ППД) для птиці у стандартному розчині // Кассіч Ю. Я., Завгородній А. І., Горжеев В. М., Стегей Б. Т., Позмогова С. А., Кассіч В. Ю.

149. Козлов В. Е. Аллергены для диагностики туберкулёза: совершенствование производства и стандартизация : автореф. дис. ...д-ра вет. наук : 03.00.23 — биотехнология и 16.00.03 — ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология / В. Е. Козлов; [ВИЭВ]. — М., 2007. — 42 с.

150. Козлов В. Е. Оценка активности национального стандарта туберкулина (ППД) для млекопитающих относительно 1-го международного стандарта туберкулина (*PPD*) *bovine* / В. Е. Козлов, В. М. Безгин, К. В. Шумилов // Вет. патология «Современные проблемы диагностики и профилактики туберкулёза животных», Научно-практич. журн. по фундаментальным и прикладным вопросам ветеринарии. М., 2004. — № 1-2 (9). — С. 85–89.

151. Контроль худоби на наявність туберкульозу в країнах-членах ЄС / Ю. О. Колос, В. І. Хоменко, В. Ф. Титаренко, О. М. Клименко // Тези доп. Міжнар. наук.-прак.конф. «Епізоотологія і профілактика інфекційних хвороб великої рогатої худоби» 14 -17 березня 2006 року. — Київ. — НАУ. — С. 15.

152. Колоскова Э. Л. Патоморфологические изменения у животных, зараженными разными видами микобактерий : автореф. дис. ...канд. вет. наук: 16.00.03 / Э. Л. Колоскова // ВИЭВ. — М., 2007. — 22 с.

153. Комиссаров А. В. Изучение процесса стерилизующей фильтрации жидкого противосибирезвенного лошадиного глобулина / Комиссаров А. В., Комоско Г. В., Лещенко А. А. и др. // Биотехнология, 2002. — № 2. — С. 66–74.

154. Корнієнко Л. Є. Теоретичні та практичні аспекти виготовлення гіперімунних сироваток (на моделі вірусів Ауєскі, геморагічної хвороби кролів і чуми м'ясоїдних) : автореф. дис. ...докт. вет. наук : 16.00.03 (ветеринарна мікробіологія та вірусологія) / Л. Є. Корнієнко. — Київ, 2006. — 56 С.

155. Краснов В. А. Туберкулёз: общие закономерности эпидемического процесса в России и за Уралом» / В. А. Краснов, О. В. Ревякина, П. Н. Филимонов, Д. В. Степанов // Туберкулёз и болезни лёгких, Т. 2016 – №10. – С. 5–12.

156. Краснов В. А. Эффективность выявления туберкулёза микробиологическими методами в Сибирском и Дальневосточном Федеральных округах / В. А. Краснов, А. Г. Чередниченко, О. В. Ревякина, Т. И. Петренко – «Туберкулёз и социально-значимые заболевания», 2016. – № 2 – С.14–16.

157. Курандо Е. Э. Совершенствование бактериологической диагностики туберкулеза животных в условиях изменяющейся эпизоотической ситуации : автореф. дис. ...канд. вет. наук : 16.00.03 / Е. Э. Курандо ; РАСХН. – Москва, 2010. – 20 с.

158. Лазовская А. Новые методы диагностики и идентификации // Ветеринарная газета., М.: Издатели: Департамент ветеринарии минсельхоза Росси, Росзооветснабпром, 1999. – №5–6. – С. 6.

159. Лазовская А. Л., Серологическая диагностика туберкулеза крупного рогатого скота / А. Л. Лазовская., В. П. Сафронов, Е. М. Максимова // Туберкулез крупного рогатого скота и меры борьбы с ним. – К., 1986. – С. 90–96.

160. Лебедева Л. В Чувствительность к туберкулину и инфицированность микобактериями туберкулеза у детей / Л. В. Лебедева, С. Г. Грачева // Пробл. туб. — М., 2007. — №1. С.11-17.

161. Леви Д. Т. Современные препараты туберкулина — методы получения, контроля, стандартизации и применения : дис. ...докт. мед. наук: 03.00.07 / Д. Т. Леви; Госуд. НИИ станд. и контр, мед. биол. преп. им. Л. А. Тарасевича. – М., 1987. 291с.

162. Линникова М. А. Выращивание туберкулезных бацилл и приготовление туберкулинов на синтетических средах / М. А. Линникова, Л. П. Соловьева // Проблемы туберкулеза. М., 1940. – № 6. – С. 69–73.

163. Линникова М. А. Биологические свойства белковых фракций очищенного туберкулина / М. А. Линникова, З. М. Жукова // ЖМЭИ, 1944. № 10-11. – С. 50–52.
164. Лысенко А. П. Иммунохимический анализ хроматографических фракций *M. bovis* и *M. tuberculosis* / А. П. Лысенко // Ветеринария, М., 1987. – № 12. – С. 32–36.
165. Мазур В. М. Епізоотологічне значення та біологічні властивості мікобактерій, виділених від ондатр : автореф. дис. ...канд. вет. наук: спец. 16.00.03. «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія» / В. М. Мазур. – К.: 2011. – 22 с.
166. Мандигра М. С. Актуальні проблеми ветеринарної науки в Україні / М. С. Мандигра // Здоров'я тварин та ліки. – 2013. – №12 (145). – С.12–13.
167. Мандро Н. М. Особенности эпизоотического процесса туберкулеза сельскохозяйственных и диких животных и совершенствование методов его контроля / дис. ... доктора ветеринарных наук по спец 16.00.03 (Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология) / Н. М. Мандро. – Новосибирск, 2001. – 423 С.
168. Мартма О. В. Туберкулез сельскохозяйственных животных и меры борьбы с ним / О. В. Мартма, Ю. Я. Кассич, А. Т. Борзяк, А. Ф. Комчарский, Н. П. Овдиенко, М. Павлас // Тарту, 1990. – 195 с.
169. Модель Л. М. О синтетических средах для туберкулезных бацилл / Л. М. Модель // Лабораторная практика. — 1928. – № 5. – С. 17–19.
170. Мулдер М. Введение в мембранную технологию: Пер. с англ. / М. Мулдер. – М.: Мир. 1999. – 513 с.
171. Мурашкина Г. С. Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в Дальневосточном федеральном округе в 2003-2008 гг. / Г. С. Мурашкина, Т. В. Алексеева, Н. М. Новикова, О. В. Ревякина, С. Т. Силайкина // Туберкулез и болезни легких. – 2010. – №10. – С. 10–16.

172. Мурашкина Г. С. Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в Сибирском федеральном округе / Г. С. Мурашкина, Т. В. Алексеева, Н. М. Новикова, О. В. Ревякина, С. Т. Силайкина. – Материалы конференции «Совершенствование оказания медицинской помощи больным туберкулезом» (сборник статей). – Омск. – 2011. – С.5–7.

173. Мясоедов Ю. М. Изучение биохимических и биологических свойств ППД туберкулина для млекопитающих и его стандартизация: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04, 16.00.03 / Ю. М. Мясоедов // Курская государственная сельскохозяйственная академия им. проф. И. И. Иванова. – Курск, 2006. – 115 с.

174. Найманов А. Х. Проблемы диагностики и профилактики туберкулёза крупного рогатого скота в современных условиях. / А. Х. Найманов // Ветеринарная патология. –2004. –1-2 (9). –С. 18 – 23.

175. Найманов А. Х. Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота в индивидуальных хозяйствах / А. Х. Найманов, Н. П. Овдиенко, Н. П. Помыканов // Мат. международной научно-прак. конф. «Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных.» Москва. – 2006. – С. 297-302.

176. Найманов А. Х. Сравнительное изучение симультанной пробы с ППД-туберкулином для млекопитающих и птиц с симультанной пробой с ППД-туберкулином для млекопитающих и КАМ / А. Х. Найманов, Н. П. Овдиенко, Н. П. Помыканов // Мат. международной научно-прак. конф. «Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных.» Москва., 2006. – С. 303–305.

177. Нуратинов Р. А. Туберкулез крупного рогатого скота в республиках Северного Кавказа и Калмыкии (эпизоотология, проблемы дифференциальной диагностики и меры ботьбы) : автореф. дис. ...доктора вет. наук: 16.00.03 / Р. А. // ВИЭВ РАСХН., М.,1998. – 36 с.

178. Нуратинов Р. А. Туберкулез / Р. А. Нуратинов, М Г. Газимагомедов // – Махачкала: «Планета – Дагестан». – 2009 – 336 с.

179. Обоева Н. А. Оптимизация методов контроля благополучия стад крупного рогатого скота по туберкулезу : автореф. дис. канд. вет. наук : 06.02.02 / Н. А. Обоева ; РАСХН. – Якутск, 2010. – 41 с.

180. Овдиенко Н. П. Мониторинг туберкулеза крупного рогатого скота в зоне радиоактивного загрязнения / Н. П. Овдиенко, В. Д. Сыпин, В. Ю. Кассич // Ветеринария. – 2002. – №3. – С.5–10.

181. Овдиенко Н. П. О патогенности атипичных микобактерий для лабораторных животных / Н. П. Овдиенко, В. И. Косенко, Н. Г. Толстенко, О. В. Якушева, В. С. Суворов, Э. Л. Колоскова // Ветеринарная патология № 1-2. – 2004. – С.150–153.

182. Овдиенко Н. П. Эпизоотическая обстановка по туберкулёзу крупного рогатого скота в зарубежных странах в начале XXI века / Н. П. Овдиенко, А. Х. Найманов, И. В. Солодова // Ветеринарная патология. Современные проблемы диагностики и профилактики туберкулёза животных. – 2004. – № 1– 2(9). – С. 51–54.

183. Овдиенко Н. П. Бактериологическая диагностика туберкулеза животных / Н. П. Овдиенко, А. Х. Найманов, Ю. И. Смоляков [и др.] // Ветеринария. – 2006. – № 12. – С. 3–5.

184. Одинаев К. А. Туберкулез птиц в юго-восточном регионе Таджикистана : автореф. дис. ...канд. вет. наук : 06.02.02 / К. А. Одинаев; Душанбе, 2012. – 20 с.

185. Осипова Е. П. Применение полимеразной цепной реакции для идентификации микобактерий и ее диагностическая значимость при туберкулезе крупного рогатого скота : автореф. дис. ...канд. вет. наук : 16.00.03 / Е. П. Осипова ; РАСХН. – Москва, 2004. – 21 с.

186. Оценка эпидемиологической ситуации по туберкулезу в сельском районе Харьковской области современных условиях / Семишев В. И., Панченко Д. С. // Епідеміологічні дослідження в клінічній та профілактичній медицині: досягнення та перспективи. — матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, (12-13 берез., 2015 р., Харків, Україна), присвяч. 210-й

річниці Харків. нац. мед. ун-ту та 85- річчю каф. епідеміології.// Епідеміологічні дослідження в клінічній та профілактичній медицині: досягнення та перспективи. — Харків, 2015. — С. 206–209.

187. Палий А. П. Испытания дезинфектантов для уничтожения микобактерий / А. П. Палий, А. И. Завгородний, Е. П. Евглевская // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. — Вып.3, 2013. — С. 84–85.

188. Туберкулоцидні властивості дезінфектантів закордонного та вітчизняного виробництва / Палій А. П., Завгородній А. І., Стегній Б. Т., Мандигра Ю. М. // Вип. 99.// Ветеринарна медицина. — Харків, 2014. — Вип. 99. — С. 73–76.

189. Палий А. П. Бактерицидные свойства дезинфектантов серии «Неодез» относительно микобактерий / А. П. Палий, А. И. Завгородний, Р. А. Дубин, А. В. Ведмидь // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. — 2016. — Вып.4 (102).— С.55–58.

190. Парр Г. С. Ультрафильтрационные процессы выделения биологически активных веществ / Г. С. Парр, Т. И. Романская. — М.: ЦБНТИ медпром, 1986.—32 с.

191. Пасечник О. А. Молекулярно-генетическая характеристика лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* в Омской области / О. А. Пасечник, В. Л. Стасенко, М. А. Дымова, М. П. Татаринцева, Л. П. Колесникова // Инфекционные болезни. — 2016. — Т. 14. — № 1. — С. 224.

192. Притыченко А. Н. Эффективность туберкулина очищенного при выявлении животных, инфицированных *Mycobacterium tuberculosis* / А. Н. Притыченко // Животноводство и ветеринарная медицина. — 2013. — Издательство учреждение образования Белорусская государственная сельскохозяйственная академия. — Минск. — С. 39–44.

193. Притыченко А. Н. Оценка стандартности серии туберкулина очищенного по молекулярному составу / А. Н. Притыченко // Актуальные

проблемы интенсивного развития животноводства, 2013. – Белорусская государственная сельскохозяйственная академия. – С. 306–314.

194. Притыченко А. Н. Биоэквивалентность туберкулина очищенного для млекопитающих и ППД туберкулина в симультанной пробе / А. Н. Притыченко, А. П. Лысенко, В. В. Власенко, Т. В. Фарноник // науковий вісник ЛНУВМБТ ім. С. З. Гжицького, Том 16 №2 (59) Частина 1, 2014. – 277–286.

195. Пинчук Л. Н., Методы в таксономии и идентификация микобактерий // Л. Н. Пинчук, Н. Н. Лазовская. – Горький, 1989. – 123 С.

196. Платэ Н. А. Мембранные технологии авангардное направление развития науки и техники XXI века. / Н. А. Платэ // Крит. технол. Мембраны. –1999. – № 1. – С. 4–13.

197. Получение невыпаренного безбелкового туберкулина и его диагностические свойства / Евглевский А. А., Беляев А. С., Алехин В. А. и др. // Сб. науч. работ Сибирского научно-исслед. вет. ин-та. — Омск, 1974.— Т. 21.—С. 82. – 85.

198. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини / Б. Т. Стегній, А. П. Герілович, О. Ю. Лиманська та ін. – УААН. – ННЦ ІЕКВМ. – 2006. – 108 с.

199. Полимеразная цепная реакция в диагностике туберкулеза / Р. Ш. Валиев, Т. Х. Фаизов, Л. И. Зайнуллин, Н. Р. Валиев // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2005. – № 3. – С. 25. –27.

200. Поліморфізм і мінливість *M. bovis* швидко- та повільнорослих штамів / О. А. Ткаченко, М. В Білан, В. В Зажарський. [та ін.] // Вет. медицина України. – 2009. – № 3. – С. 30–33.

201. Полякова О. Н. Совершенствование ранней диагностики туберкулеза животных : автореф. дис. ...канд. вет. наук : 06.02.02 / О. Н. Полякова ; РАСХН. – Новочеркасск, 2011. – 40 с.

202. ППД-туберкулін для ссавців виробництва Сумської біофабрики / А. І. Завгородній, П. М. Тихонов, В. В. Білушко, І. М. Дегтярьов, В. Г. Скрипник // Вет. медицина України. — 2006. — № 2. — С. 34–35.
203. ПЦР в реальном времени для диагностики туберкулеза / Алипер Т. И., Потапова Н. И., Непоклонов Е. А., Забрежный А. Д. и др. // Ветеринарная жизнь. — 2006. — № 7-8. — С.13.
204. Романенко В. Ф. Изменчивость видов микобактерий туберкулеза при адаптации к организму животных / В. Ф. Романенко, П. И. Вербицкий, А. М. Дяченко, Н. А. Кравченко, О. О. Мытыкин / Ветеринарна медицина. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. — 2003. — Вип. 82. — С.486–491.
205. Румачик И. И. Особенности эпизоотической ситуации в некоторых неблагополучных по туберкулезу крупного рогатого скота хозяйствах Беларуси / И. И.Румачик, А. А.Холод // Труды Бел. НИИЭВ.—№ 32.—Минск. —1996.— С.97–101.
206. Свешников П. Г. Роль белков теплового шока в развитии реакций врождённого иммунитета / П. Г. Свешников, В. В. Малайцев, В. И. Киселёв // ЖМЭИ. — 2007. — № 5. — С. 96 – 106.
207. Свириденко Н. А. Применение озона в бактериологической диагностике туберкулеза : автореф. дис. ...канд. вет. наук : 16.00.03 / Н. А. Свириденко; РАСХН. — Омск, 2008. — 20 с.
208. Свитцов А. А. Новые технические решения по снижению влияния концентрационной поляризации на мембранное разделение / А. А. Свитцов, Р. А. Одинцов, А. В. Молотков // Крит. технол. Мембраны, 2001. — № 10. — С. 25–29.
209. Семенов Б. Ф. Концепция создания быстрой иммунологической защиты от патогенов / Б. Ф. Семёнов, В. В. Зверев // ЖМЭИ. — 2007. — № 4. — С. 93–100.
210. Семенов Б. Ф. Врожденный иммунитет и защита от патогенов / Б. Ф. Семенов // Вестник биотехнологии. —2006. — Т. 2. — № 2. — С. 54–57.

211. Свитцов А. А. Новые технические решения по снижению влияния концентрационной поляризации на мембранное разделение / А. А. Свитцов, Р. А. Одинцов, А. В. Молотков // Крит. технол. Мембраны. 2001. – № 10. – С. 25–29.

212. Сытник Д. А. Санитарно-бактериологические исследования воздушной среды животноводческих помещений и контроль качества дезинфекции : автореф. ... дис. канд. вет. наук : 06.02.02 (ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология) / Д. А. Сытник. — Ставрополь, 2016. — 21 с.

213. Ситнік В. А. Епізоотологія та профілактика туберкульозу великої рогатої худоби в сучасних умовах ведення тваринництва : автореф. дис... канд. вет. наук: 16.00.08 / В. А. Ситнік; Нац. аграр. ун-т. — К., 2003. — 21 с.

214. Скрипник А. В. Молекулярно-генетична диференціація мікобактерій, виділених в Україні, та їх філогенетичні взаємозв'язки : автореф. дис. ...канд..вет.наук : 16.00.03 / Скрипник А. В., УААН. — Харків, 2007. — 19 с.

215. Слина К. Н. Усовершенствование диагностики туберкулеза и нокардиоформных актиномицетных инфекций (эпизоотология, диагностика, профилактика) : автореф. дис. канд. вет. наук : 06.02.02 / Слина К. Н.; РАСХН. — Нижний Новгород, 2009. — 21 с.

216. Смирнов А. Н. Современные проблемы диагностики туберкулеза животных / А. Н. Смирнов // Ветеринарная патология. — 2004. — №1-2 (9). — С. 10–13.

217. Смолянинов Ю. И. Экономический ущерб от туберкулеза крупного рогатого скота в России / Ю. И. Смолянинов, Н. А. Донченко, С. Ю. Смолянинов, В. Ф. Бордюг, Н. Н. Кошечев // Ветеринарная патология. — 2005. — №1(12). — С.104–112.

218. Стегній Б. Т. Туберкулоцидна активність деяких біотехнологічних дезінфекційних препаратів / Б. Т. Стегній, А. І. Завгородній,

А. П. Палій, Ю. М. Мандигра // Вісник аграрної науки. – 2015. – № 4. – С. 31–33.

219. Суханов И. П. Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота с применением полимеразной цепной реакции : автореф. дис. канд. вет. наук : 16.00.03 / И. П. Суханов ; РАСХН. – Москва, 1999. – 19 с.

220. Ткаченко О. А. Характеристика причин тривалого епізоотичного процесу туберкульозу великої рогатої худоби / О. А.Ткаченко, Л. О. Ковальова // Вісник Дніпропетр. держ. гарн.ун-ту. – Дніпропетровськ, 2002.–№ 1.– С. 72–74.

221. Ткаченко О. А. Вплив личинок нематод на перебіг інфекційного процесу туберкульозу в експериментально заражених морських свинок / О. А. Ткаченко, І. М. Шендрик // Науково-технічний бюлетень ДНДКІ – Львів, 2012 – Вип. 13. – № 1–2. – С. 276–281.

222. Біологічні властивості дисоціативних L- та інших форм *M. bovis* / О. А.Ткаченко, І. М. Щендрик, В. В. Місків, А. В. Ковальов // Ветеринарна медицина України. – 2013. – № 4 (206). – С. 10–14.

223. Ткаченко О. А. Біологічний цикл розвитку *Mycobacterium bovis* / О. А. Ткаченко // Вет. медицина України. – 2014. – № 10.– С. 15–20.

224. Ткаченко О. А. Фільтривні форми у біологічному циклі розвитку дисоціативних *Mycobacterium bovis* / О. А. Ткаченко, Н. В. Алексєєва, В. В. Зажарський // Науково-технічний бюлетень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК. – Дніпропетровськ, 2015. – т. 3, № 2. – С. 78–84.

225. Тоен Ш. О. Туберкулєз у диких и домашних млекопитающих / Пер. с англ. // Туберкулєз. Патогенез, защита, контроль. Под ред. Барри и Блума. – М.: Медицина, 2002. С. –167–173.

226. Толстенко Н. Г. Патомормологические изменения у лабораторных животных, зараженных нетуберкулезными микобактериями / Э. Л. Колоскова, О. В. Якушева, В. С. Суворов, Н. Г. Толстенко, Е. Э. Соколова // Материалы Международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения

Я. Р. Коваленко. Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных. – М., 2006. – С. 252.

227. Толстенко Н. Г. О патогенности атипичных микобактерий для морских свинок и белых мышей / Н. Г. Толстенко, Э. Л. Колоскова, В. С. Суворов, Е. А. Касьянова, Е. Э. Соколова // Материалы Международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Я. Р. Коваленко. Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных. – М., 2006. – С. 390–393.

228. Толстенко Н. Г. Патогенные свойства некоторых видов микобактерий, выделенных от животных и объектов внешней среды : автореф. дис. ...канд. вет. наук : 16.00.03 / Н. Г. Толстенко ; РАСХН. – Москва, 2006. – 21 с.

229. Троцький М. С. Про стан епізоотичної ситуації в Україні та здійснення заходів щодо запобігання хворобам тварин та птиці / М. С. Троцький // Сучасна ветеринарна медицина: науково-виробничий журнал для спеціалістів ветеринарної медицини. – 2012. – №2. – С.16–19.

230. Туберкулез сельскохозяйственных животных / [Колычев А. М., Кассич Ю. Я., Мартма О. В. и др]; Под ред. В. П. Шишкова и В. П. Урбана. – М.: ВО «Агропромиздат», 1991. — 255 с.

231. Туберкулез в Україні : (аналіт.-стат. довід.) / [Н. М. Нізова та ін.; відп. ред.: Н. М. Нізова, В. Голубчиков]. — Київ : Бланк-Прес, 2015. —26 с.

232. Туберкулез в Україні : (аналіт.-статист. довід. за 2000–2011 рр.) / М-во охорони здоров'я України, Держ. служба України з питань протидії ВІЛ-інфекції СНІДУ та ін. соц.-небезпеч. захворювань, Держ. закл. "Центр мед. статистики МОЗ України", Держ. закл. "Всеукр. центр контролю за туберкулезом МОЗ України" ; [голов. ред.: Толстанов О. К. ; розроб.: Недоспасова О. П. та ін.]. — Київ : Поліум, 2012. — 97 с.

233. Тупота С. Г. Комплексная сравнительная оценка эпизоотической ситуации туберкулеза животных и методов его диагностики в

сельхозпредприятиях и личных подсобных хозяйствах : автореф. дис. ...канд. вет. наук : 06.02.02 / С. Г. Тупота ; РАСХН. – Новосибирск, 2010. – 20 с.

234. Фещенко Ю. І. Сучасні методи діагностики, лікування і профілактики туберкульозу / Ю. І. Фещенко, В. М. Мельник. – К.: Здоров'я, 2004. – 904 с.

235. Фещенко Ю. І. Туберкульоз: організація діагностики, лікування, профілактики та контролю за смертністю / Ю. І. Фещенко, В. М. Мельник, Л. В. Турченко, С. В. Лірник. — Київ : Здоров'я, 2010. — 447 с. : табл. — Бібліогр.: С. 444–447.

236. Фещенко Ю. І. Організація протитуберкульозної допомоги населенню : сучасні підходи / Ю. І. Фещенко, В. М. Мельник. — Київ : Здоров'я, 2012. — 655 с.

237. Фрадкин В. А. Диагностические и лечебные аллергены / В. А. Фрадкин — М.: Медицина, 1990. – 256 с.

238. Фтизиатрия / Мишин В. Ю., Завражнов С. П. Митронина А. В., Григорьев Ю. Г. – ГЭОАТ-Медиа, 2015. – 520 С.

239. Хаитов Р. М. Иммунология / Р. М. Хаитов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 320 с.

240. Чередниченко А. Г. Молекулярные основы возникновения лекарственной устойчивости у *Mycobacterium tuberculosis* / А. Г. Чередниченко, М. А. Дымова, А. Н. Ширшова, Е. А. Храпов, У. А. Кожамкулов, Т. И. Петренко, М. Л. Филипенко // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2012. Т. – 10. – № 2. – С.243–251.

241. Шаров А. Н. Полимеразная цепная реакция при диагностике туберкулеза / А. Н. Шаров, И. П. Суханов, Л. А. Ерошенко // Сборн. материалов научной сессии РАСХН «Состояние, проблемы и перспективы развития вет.науки России» (к 100-летию юбилею ВНИИЭВ им.Я.Р.Коваленко). – 1999. – Т.1.– Москва. – С.188–189.

242. Полимеразная цепная реакция при диагностике туберкулеза / Шаров А. Н., Ерошенко Л. А., Суханов И. П. Кальнов С. Л., Гребенникова Т. В., Грабовецкий В. В. // Ветеринария. – 2000. – № 10. – С.19–22.

243. Шевырев Н. С. Биологическая и химическая характеристика и стандартизация туберкулинов, изготовленных различными способами: дис. ... канд. вет. наук: 16.803 / Н. С. Шевырев; Харьковский зоовет. ин-т. – Курск. – 1971. – 159 с.

244. Шевырев Н. С. Способ получения туберкулина. Патент на изобретение № 2131263. Опубл. 10.08.1999.

245. Шендрик І. М. Роль личинок *Strongyloides papillosus* в інфекційному процесі туберкульозу (в експерименті на мурчаках) : дис. ...канд. вет. наук: спец. 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія» / І. М. Шендрик. – Дніпропетровськ. – 2016. – 157 с.

246. Шендрик І. М. Роль личинок *Strongiloides papillosus* в інфекційному процесі туберкульозу (в експерименті на мурчаках) : автореф. дис. ...канд. вет. наук : спец. 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія » / І. М. Шендрик. – Київ, 2016.– 21 с.

247. Верховна Рада України. Комітет з питань аграрної політики та земельних відносин. Рішення від 16 травня 2017 року Про схвалення рекомендацій комітетських слухань на тему: «Стан епізоотичної ситуації в Україні. Забезпечення надійних та ефективних заходів ліквідації і попередження спалахів хвороб тварин».

248. Рекомендації комітетських слухань на тему: «Стан епізоотичної ситуації в Україні. Забезпечення надійних та ефективних заходів ліквідації і попередження спалахів хвороб тварин» Схвалено рішення Комітету Верховної Ради України з питань аграрної політики та земельних відносин від 16.05.2017, протокол № 55.

249. Abel B., Thieblemont N., Quesniaux V J. et al. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice // J. Immunol. 2002. – Vol. 169(6): P. 3155 – 3162.

250. "Acid-Fast Stain Protocols". 21 August 2013. Archived from the original on 1 October 2011. Retrieved 26 March 2016.

251. Ahmed N., Hasnain S. (2011). "Molecular epidemiology of tuberculosis in India: Moving forward with a systems biology approach". Tuberculosis. **91** (5):4073. doi:10.1016/j.tube.2011.03.006. PMID 2151 4230.

252. Acton, Q. Ashton (2011). Mycobacterium Infections: New Insights for the Healthcare Professional. ScholarlyEditions. p. 1968. ISBN 978-1-4649-0122-5. Archived from the original on 6 September 2015.

253. Allen M. J. Polysaccharide recognition by surfactant protein D / M. J. Allen A. Laederach, P. J. Reilly, Mason R. J.: novel interactions of a C-type lectin with nonterminal glucosyl residues // Biochemistry. – 2001. Vol.40. – P. 7789 – 7798.

254. Alshevskaya A. A.Expression of membrane-bound receptors to tumor necrosis factor alpha in active pulmonary tuberculosis /A. A. Alshevskaya, Z. A. Laushkina, F. D. Kireev, J. A. Lopatnikova, S. V. ennikov // The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. – 2014. – №.11. – V.18. – Suppl. 1. S.99.

255. Amadori M. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis / Amadori M., Lyashchenko K. P., Gennaro M. L. et al. // Vet. Microbiol. 2002. – Vol. 85. – P. 379 – 389.

256. Ashitani J., Mukae H., Hiratsuka T. et al. Elevated levels of alpha-defensins in plasma and BAL fluid of patients with active pulmonary tuberculosis // Chest. 2002. – Vol. 121(2) – P. 519 – 526.

257. Batirshina Y. Population-based study of fluoroquinolone-resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Novosibirsk Oblast, Russian

Federation / Y. Batirshina, T. Petrenko, P. Filimonov. - Eur. Respir. J. - 2012. - 40: Suppl. 56. – S. 255.

258. "BCG Vaccine Usage in Canada – Current and Historical". Public Health Agency of Canada. September 2010. Archived from the original on 30 March 2012. Retrieved 30 December 2011.

259. Bento, J; Silva, A. S; Rodrigues, F; Duarte, R (Jan–Feb 2011). "[Diagnostic tools in tuberculosis]". Acta Médica Portuguesa. 24 (1): 145–54. PMID 21672452.

260. Bilushko V. V., Zavgorodniy A. I., Bilushko E. V. Development of software for calculating the biological activity of mycobacterial allergens // Journal for veterinary medicine, biotechnology and biosafety. – 2015. – T 1 № 2. – C. 32–34.

261. Bozzano F. (2014). "Immunology of tuberculosis". Mediterr J Hematol Infect Dis. 6 (1): e2014027. doi:10.4084/MJHID.2014.027. PMC 4010607 . PMID 24804000.

262. Bordet C. Cell walls of nocardial and related acrinomycetes: identical of the genus Nocardia by cell walls analysis / C. Bordet // Z. syst Bacteriol – 2008. – 22. – N4 – P. 251–259.

263. Branger J., Leemans J. C., Florquin S. et al. Toll-like receptor 4 plays a protective role in pulmonary tuberculosis in mice // Int. Immunol. – 2004. – Vol. 16(3) – P. 509 – 516.

264. Chaisson, R. E; Martinson, N. A (13 March 2008). "Tuberculosis in Africa—combating an HIV-driven crisis". The New England Journal of Medicine. 358 (11): 1089–92. doi:10.1056/NEJMp0800809. PMID 18337598.

265. Cherednichenko A. G. Detection and Characteristics of Rifampicin-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* / A. G. Cherednichenko, M. A. Dymova, O. A. Solodilova, T. I. Petrenko, A. I. Prozorov, M. L. Filipenko // Bull. Exp. Biol. Med. – 2016. Mar. – V. 60. – T 5. – P.659–663.

266. "Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know" (PDF) (5th ed.). Centers for Disease Control and Prevention (CDC),

Division of Tuberculosis Elimination. 2011. p. 24. Archived (PDF) from the original on 19 May 2012.

267. Diseases, Special Programme for Research & Training in Tropical (2006). Diagnostics for tuberculosis: global demand and market potential. Geneva: World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. p. 36. ISBN 978-92-4-156330-7. Archived from the original on 6 September 2015.

268. Dolin, [edited by] Gerald L. Mandell, John E. Bennett, Raphael (2010). Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases (7th ed.). Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier. pp. Chapter 250. ISBN 978-0-443-06839-3.

269. Dias A. T., de Castro S. B., Alves C. C., Rezende A. B., Rodrigues M. F., et al/ (2011) Lower production of IL-17A and increased susceptibility to *Mycobacterium bovis* in mice coinfecting with *Strongyloides venezuelensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 106 617-619.

270. Dunne A., Kim-Berger H., Zimmermann S. et al. Atypical *mycobacterial tuberculosis* — a diagnostic and therapeutic dilemma? Case reports and review of the literature // Otolaryngol. Pol. 2003. – Vol. 57. – P. 17 – 23.

271. Dymova M. A. Whole genome-sequencing of non-tuberculous mycobacteria / M. Dymova, O. Alkhovik, L. Evdokimova, A. Cherednichenko, T. Petrenko, Ya. Batyrshina // European Respiratory Journal. – 2016. – September. – Volume 48. – Supplement 60. – PA891.

272. Improvement of the culture method while tuberculosis study / M. Kalashnyk, A. Zavgorodniy, B. Stegnyy, A. Paliy. CBEP Ukraine Research Forum and Peer Review Session (Kyiv, Ukraine, 4–8 April 2016) : abstr. Kyiv, 2016. P. 55.

273. John Mason Good; Samuel Cooper; Augustus Sidney Doane (1835). The Study of Medicine. Harper. p. 32. Archived from the original on 10 August 2016.

274. Falkinham J. Nontuberculous mycobacteria in the environment // Clin. Chest < Med, 2002. – Vol. 23. – P. 529–551.

275. Felker I. The spectrum of *M. Tuberculosis* as a predictor of treatment failure for patients who suffer from MDR-TB / O. Filinyuk, I. Felker, G. Yanova // The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease., 2013. – Vol. 17 (№12). – S. 553.

276. Field S., Fisher D., Cowie R. *Mycobacterium avium complex* pulmonary disease in patients without HIV infection // Chest. 2004. – Vol. 126. – P. 566–581.

277. Field S., Cowie R. Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria // Chest. 2006. Vol. 129. – P. 1653–1672.

278. Fremont C.M., Yermeev V., Nicolle D.M. et al. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88// J. Clin. Invest. 2004. Vol. 114(12) – P.1790–1799.

279. Zaugorodni A. I. Utilisation de bacteriophages pour identifier des types de mycobactéries (англ-франс.) / A. I. Zaugorodni, V. U. Kassich // Advanced school on: Walls of mycobacteria and tuberculosis. – Kiev (Ukraine), 1995. – P.27.

280. Zenkov N. K., Chechushkov A. V., Kozhin P. M., Kolpakova T. A., Menshchikova E. B. Macrophage and mycobacterium: the war without beginning or end // Biology bulletin reviews, 2016. T. 6. № 4. C. 289–308.

281. Heifets L. Mycobacterial infections caused by nontuberculous mycobacteria // Semin. Respir. Crit. Care Med. 2004. – Vol. 25. – P. 283–295.

282. Gamier T. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis* / Gamier T., Eiglmeier K., Camus J.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. – Vol. 100. – № 13. – P. 7877–7882.

283. Ghadiali A., Strother M., Naser S. et al. *Mycobacterium avium subsp.* Paratuberculosis strains isolated from Crohn's disease patients and animal species exhibit similar polymorphic locus patterns // J. Clin. Microbiol. — 2004. Vol. 42. – P. 5345–5348.

284. Goren M. B. Mycobacterial lipids: selected topics. /M.B. Goren// Bacteriol. Revs. –2009. –36. –N1. –P.33–36.

285. Granucci F., Zanoni I., Feau S., Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity // *EMBO J.* 2003. – Vol. 22(11).– P.2546–2551.

286. Hawn T. R.; Day T. A.; Scriba T. J.; Hatherill M.; Hanekom W. A.; Evans T. G.; Churchyard G. J.; Kublin J. G.; Bekker L. G.; Self S. G. (December 2014). "Tuberculosis vaccines and prevention of infection". *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR.* **78** (4): 650–71. doi:10.1128/MMBR.00021-14. PMC 4248657. PMID 25428938.

287. Kabra, [edited by] Vimlesh Seth, S.K. (2006). *Essentials of tuberculosis in children* (3rd ed.). New Delhi: Jaypee Bros. Medical Publishers. p. 249. ISBN 978-81-8061-709-6. Archived from the original on 6 September 2015.

288. Karumbi, Jamlick; Garner, Paul (2015-05-29). "Directly observed therapy for treating tuberculosis". *The Cochrane Database of Systematic Reviews* (5): CD003343. doi:10.1002/14651858.CD003343.pub4. ISSN 1469-493X. PMC 4460720. PMID 26022367.

289. Kassich V. U. Radioresistance of mycobacteria (Resistans aux radiationsdes Mycobacttria) англ-франс. / V. U. Kassich // *Advanced school on: Walls of mycobacteria and tuberculosis.* – Kiev (Ukrain), 1995. – P.28.

290. Kato T., Sakamoto E., Kutsuna H. et al. Proteolytic conversion of STAT3alpha to STAT3gamma in human neutrophils: role of granule-derived serine proteases // *J. Biol. Chem.* 2004. – Vol.279(30). – P. 31076 – 3180.

291. Katoch V. Infections due to nontuberculous mycobacteria (NTM) // *Indian J. Med. Res.* 2004. – Vol. 120. – P. 290–304.

292. Kobayashi K. Nucleotide sequence of MPB63 gene in *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo / Kobayashi K., Kamiie K., Kobayashi A. // *Basic Microbiol.*, 2003. – Vol. 43. – № 3. P. 249–254.

293. Koch R. Fortsetzung der Mitteilungen iiber das Stailmittel gegen Tuberculose / Koch R. // *Dtsch. Med. Wsch.* 1891. – № 17. – S. 101–102.

294. Koziol-Montewka M., Kolodziejek A., Oles J., Janicka L. Proinflammatory cytokine profile in active kidney tuberculosis patients// Immunol. Invest. – 2004. Vol.33(3) – P.277–285.

295. Kulka M., Alexopoulou L., Flavell R. A., Metcalfe D. D. Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3// J. Allergy Clin. Immunol.– 2004. Vol.114(1) – P.174–182.

296. Kulchavenya E. Tuberculosis control in Siberia and Far East for extrapulmonary form / E. Kulchavenya // Eur. Resp. Soc.: Abstracts.- Barcelona.- Sept.18-19, 2010. –№ P. 31–65.

297. Kulchavenya E. Tuberculosis control in Siberia and Far East for extrapulmonary form / E. Kulchavenya // Eur. Resp. Soc.: Abstracts.- Barcelona.- Sept.18-19, 2010. –№ P. 31–65.

298. Kulchavenya E. Current trends of extrapulmonary tuberculosis in Siberia // ERS annual Congress. – Amsterdam, 2011. – 495S/ – P.26–91.

299. Kulchavenya E. Epidemiology of urogenital tuberculosis in Siberia / E. Kulchavenya // The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. – 2015. – V.19 (2). – Suppl 2. – P. 150.

300. Laushkina Zh. The analysis of factors associated with delay diagnosis of tuberculosis / Zh. Laushkina, P. Filiimonov // The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2012 – №.12. – V.16. - Suppl. 1. – S. 376.

301. Laushkina Z. Expression levels of membrane-bound tumor necrosis factor alpha receptors in active tuberculosis and healthy individuals / Z. Laushkina, A. Alshevskaya, F. Kireev, J. Lopatnikova, S. Sennikov // Eur. Respir. J., 2013. – № 42. – 57. – P. 589.

302. Lawlor, Clark. "Katherine Byrne, Tuberculosis and the Victorian Literary Imagination". British Society for Literature and Science. Retrieved 11 June 2017.

303. Lawn, S.D.; Zumla, A.I. (2 July 2011). "Tuberculosis". *Lancet*. 378 (9785): 57–72. doi:10.1016/S0140-6736(10)62173-3. PMID 21420161.

304. Lienhardt, C; Espinal, M; Pai, M; Maher, D; Raviglione, MC (November 2011). "What research is needed to stop TB? Introducing the TB Research Movement". *PLOS Medicine*. 8 (11): e1001135. doi:10.1371/journal.pmed.1001135. PMC 3226454. PMID 22140369.

305. Long E.R., Seibert F.B. Chemical composition of the active principle of tuberculin. I. A non-protein medium suitable of the production of tuberculin in large quantity // *Amer. Rev. Tuberc.* 1926. – № 13. — P. 393–397.

306. Long E.R. The assay of tuberculin / Long E.R., Milles A.A., Perry W.L.M. // *Bull. Wld. Hlth Org.* 1954. – Vol. 10. – P. 989–1002.

307. National Institute for Health and Clinical Excellence. Clinical guideline 117: Tuberculosis. London, 2011.

308. Magnusson M. Preparation of purified tuberculin RT23 / Magnusson M., Bentzon M.W. // *Bull. WHO.* 1958. – Vol. 19. – P. 829–843.

309. Mateos Colino, A. Tuberculous epididymitis caused by *Mycobacterium bovis*/ A. Mateos Colino, M.A. Sousa Escandon, R. Golpe Gomez // *Arch Esp. Urol.* – 2003. – Mar. – 56 (2). P. 175–178.

310. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. — Fifth Edition. 2004. – Vol. 1. – P. 451–463.

311. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. – 7th ed. – Vols. 1 and 2, 2012. – 1187 p.

312. Ward, A.I.; Judge, J.; Delahay, R.J. (1 January 2010). "Farm husbandry and badger behaviour: opportunities to manage badger to cattle transmission of *Mycobacterium bovis*?". *Preventive Veterinary Medicine*. 93 (1): 2–10. doi:10.1016/j.prevetmed.2009.09.014. PMID 19846226.

313. Maryn McKenna (12 January 2012). "Totally Resistant TB: Earliest Cases in Italy". *Wired*. Archived from the original on 14 January 2012. Retrieved 12 January 2012.

314. Martín Montañés, C.; Gicquel, B. (March 2011). "New tuberculosis vaccines". *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 29 Suppl 1: 57–62. doi:10.1016/S0213-005X(11)70019-2. PMID 21420568.

315. Mikota, Susan K. "A Brief History of TB in Elephants" (PDF). APHIS. US Department of Agriculture. Archived (PDF) from the original on 6 October 2016. Retrieved 5 April 2016.

316. Michel A. L. Wildlife tuberculosis in South African conservation areas: implications and challenges / A. L. Michel, R. G. Bengis, D. F. Keet et al. // *Veterinary Microbiology*.—2006.—Vol. 112, № 2-4.—P. 91–100.

317. Mitchell, M.A. (January 2012). "Mycobacterial infections in reptiles". *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice*. 15 (1): 101–11, vii. doi:10.1016/j.cvex.2011.10.002. PMID 22244116.

318. Möller, M.; Hoal, E. G. (March 2010). "Current findings, challenges and novel approaches in human genetic susceptibility to tuberculosis". *Tuberculosis*. 90 (2):71–83. doi:10.1016/j.tube.2010.02.002. PMID 20206579.

319. Naryshkina S. HIV/TB co-morbidity epidemiology in Siberian Federal District 2008-2010 / S. Naryshkina, E. Pushkareva, S. Medvedev // *Eur. Respir. J.* - 40: Suppl. 56. – 484S.

320. Niederweis M., Danilchanka O, Huff J., Hoffmann C., Engelhardt H. (March 2010). "Mycobacterial outer membranes: in search of proteins". *Trends in Microbiology*. 18 (3): 109–16. doi:10.1016/j.tim.2009.12.005. PMC 2931330 . PMID 20060722.

321. Pangborn M. C. A purified fraction from unheated cultures in testing BCG vaccinated subjects / Pangborn M. C., Birkhoug K. // *Amer. Rev. Tuberc.* — 1954. — №69. — P. 300–309.

322. Panteix, G.; Gutierrez, M. C.; Boschioli, M. L.; Rouviere, M.; Plaidy, A.; Pressac, D.; Porcheret, H.; Chyderiotis, G.; Pon.sada, M.; Van Oortegem, K.; Salloum, S.; Cabuzel, S.; Bañuls, A.L.; Van de Perre, P.; Godreuil, S (August 2010). "Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium microti*: a study of six recent cases in France". *Journal of Medical Microbiology*. 59 (Pt 8): 984–9. doi:10.1099/jmm.0.019372-0. PMID 20488936.

323. Parker L. C., Whyte M. K., Vogel S. N. et al. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists regulate CCR expression in human monocytic cells // J. Immunol. – 2004. – Vol. 172(8) – P. 4977–4986.

324. Philpott D J., Girardin S.E. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection // Mol. Immunol. 2004. – Vol. 41(11) – P.1099–1108.

325. "Provisional CDC Guidelines for the Use and Safety Monitoring of Bedaquiline Fumarate (Sirturo) for the Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis". Archived from the original on 4 January 2014.

326. "Public-Private Partnership Announces Immediate 40 Percent Cost Reduction for Rapid TB Test" (pdf). World Health Organization. 6 August 2012. Archived (PDF) from the original on 29 October 2013.

327. "Pulmonary Tuberculosis/In Literature and Art". McMaster University History of Diseases. Retrieved 9 June 2017.

328. Queval C. J., Brosch R., Simeone R. (2017). "The Macrophage: A Disputed Fortress in the Battle against Mycobacterium tuberculosis". Front. Microbiol. 8: 2284. doi:10.3389/fmicb. 2017. 02284.

329. Reavill, D. R.; Schmidt, R. E. (January 2012). "Mycobacterial lesions in fish, amphibians, reptiles, rodents, lagomorphs, and ferrets with reference to animal models". The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice. 15 (1): 25–40, v. doi:10.1016/j.cvex.2011.10.001. PMID 22244111.

330. Raja A. Immunology of tuberculosis // Indian J. Med. Res. 2004: Voll.20(4) – P.213–232.

331. Reviriego Gordejo F. J., Vermeersch J. P. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union / F.J. Reviriego Gordejo, J.P. Vermeersch // Veterinary Microbiology.–2006.–Vol.112, № 2-4.–P. 101–109.

332. Ridell M. Immunodiffusion studies of Mycobacterium, Nocardia and Rhodococcus for taxonomic purpose / M. Ridell// In: Astinomycetes. Stuttgart; New York: Ficher. –2000. –P. 235–241.

333. Roy A; Eisenhut M; Harris R. J.; Rodrigues L. Cю; Sridhar, S.; Habermann S.; Snell L.; Mangtani P.; Adetifa I.; Lalvani A.; Abubakar I. (Aug 5, 2014). "Effect of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* infection in children: systematic review and meta-analysis". *BMJ* (Clinical research ed.). 349: g4643. doi:10.1136/bmj.g4643. PMC 4122754. PMID 25097193

334. Seibert F. B. Purified protein derivative / Seibert F. B., Aronson J. D., Reichel J: // *Amer. Rev. Tuberc.* 1934. – Vol. 30. – P. 705–712.

335. Slachev G., Michailova L., Marcova N. Stress-induced L-forms of *Mycobacterium bovis*: a challenge to survivability. *New Microbiologica*, 2013, 36: 157-166.

336. Shivaprasad, H. L.; Palmieri, C. (January 2012). "Pathology of mycobacteriosis in birds". *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice*. 15 (1): 41–55, v–vi. doi:10.1016/j.cvex.2011.11.004. PMID 22244112.

337. STOPTB (5 April 2013). "The Stop TB Partnership, which operates through a secretariat hosted by the World Health Organization (WHO) in Geneva, Switzerland" (pdf). Archived (PDF) from the original on 24 January 2014.

338. The 1st International Standard for PURIFIED PROTEIN DERIVATIVE (PPD) OF MYCOBACTERIUM AVIUM TUBERCULIN / Version 04, dated 27 May 2004: NIBSC.

339. Thorel M.F. Avian Tuberculosis / Thorel M.F. // *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* — Fifth Edition. — 2004. — Vol. 2 — P. 723, P. 896–904.

340. "Tuberculosis (whole issue)". *Journal of the American Medical Association*. 293 (22): cover. 8 June 2005.

341. Tuberculosis in humans and animals: are we a threat to each other? P D O Davies *Journal of the Royal Society of Medicine* are provided here courtesy of Royal Society of Medicine Press. 2006 Oct; 99(10): 539–540.

342. "Tuberculosis". *World Health Organization*. 2002. Archived from the original on 17 June 2013.

343. "Tuberculosis Prescription Practices In Private And Public Sector In India". NJIRM. 4 (2): 71–78. Archived from the original on 10 May 2013.

344. "Tuberculosis Throughout History: The Arts" (PDF). USAID. Retrieved 12 June 2017.

345. "Tuberculosis Fact sheet N°104". WHO. October 2015. Archived from the original on 23 August 2012. Retrieved 11 February 2016.

346. The Chambers Dictionary. New Delhi: Allied Chambers India Ltd. 1998. p. 352. ISBN 978-81-86062-25-8. Archived from the original on 6 September 2015.

347. Orłowska, M. Krajewska, E. Augustynowicz-Kopeć, A. Zabost, M. Welz, S. Kaczor, K. Anusz / IZOLAC JAPRĄ TKÓWGRUŻLICY – MYCOBACTERIUM CAPRAE OD WOLNOŻYJĄ CEJSARNYŻ POLSKI CHB IES ZCZADIS OLA TIONOF MYCOBACTERIUM CAPRAE FROM A FREE R ANGINGR OEDEER FROM THE POLISH BIESZCZADY MOUNTAINS. // XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych Lublin, 22–24. 09. 2016 Sekcja zwierząt nieudomowionych i futerkowych, 2016. – P. 606-607.

348. Krajewska M., Kozińska M., Orłowska B., Welz. M., Augustynowicz-Kopeć E., Anusz K., Szulowski K. // XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych Lublin, 22 – 24.09.2016 Sekcja zwierząt nieudomowionych i futerkowych 612 10-62
TRANSMISJA MYCOBACTERIUM CAPRAE MIĘDZYTRZEMA OŚRODKA MIHODOWLI ŻUBRÓW W POLSCE TRANSMISSION OF MYCOBACTERIUM CAPRAE BETWEEN THE REEUROPEAN BISON BREEDING CENTRES IN POLAND
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy, Polska
2 Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa, Polska 3
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Warszawa, Polska 4
Wojewódzki Inspektorat Weterynarii, Krosno, Polska, 2016. – P. 612-613.

349. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis / Amadori M., Lyashchenko K. P., Gennaro M. L. et al. // Vet. Microbiol. — 2002. Vol. 85. — P. 379 – 389.
350. "Vaccine and Immunizations: TB Vaccine (BCG)". Centers for Disease Control and Prevention. 2011. Archived from the original on 17 November 2011. Retrieved 26 July 2011.
351. Velayati, A. A.; Masjedi, M. R.; Farnia, P.; Tabarsi, P.; Ghanavi, J.; Ziazarifi, A. H.; Hoffner, S. E. (August 2009). "Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran". Chest. 136 (2): 420–425. doi:10.1378/chest.08-2427. PMID 19349380.
352. Wayne L. G. Таксономические и генетические аспекты мирового распространения атипичных микобактерий // Тр. XXI Международной конференции по туберкулезу. – М., 1972. — С. 145–147.
353. Wisniewski H. G., Vilcejc J. Cytokine induced gene expression at the crossroads of innate immunity, inflammation and fertility: TSG-6 and PTX3/TSG-14 // Cytokine Growth Factor Rev. – 2004 . Vol. 15 (2-3). – P. 129–146.
354. Wolinsky E. Mycobacterial diseases other than tuberculosis // Clin. Infect. Dis. – 1992. – Vol. 15. – P. 1–12.
355. Wolinsky E. Mycobacteria in soil and their relation to disease – associated strains / E. Wolinski, T. Ryneerson // Amer. Rev. Respiral. Disease. – 2006. – 97. – N6. – P. 1032–1037.
356. World Health Organization. «Global Tuberculosis Control Report, 2006 – Annex 1 Profiles of high-burden countries» (PDF) on 26 July 2009. Retrieved 13 October 2006.
357. Yano J. Occurrence of acylated trehaloses in *Nocardia* / J. Yano, V. Furukawa, M. Kusunose // Z. Gen. Appl. Microbiol. – 2007. – 17. – N4. – P. 329–334.
358. Zink A., Sola C., Reischl U., Grabner W., Rastogi N., Wolf H., Nerlich A. (2003). «Characterisation of *Mycobacteria tuberculosis* Complex

DNAs from Egiptian Mummies by Spoligotyping». J Clin Microbiol. 41 (1):359–67. doi:10.1128/JCM.41.1.359-367.2003. PMC 149558 . PMID 12517873.

359. European Pharmacopoeia. 8th ed. Strasbourg: Council of Europe. 2014. 6111 p.

360. <http://www.ait-magazine.com.ua/news/epizootichna-situaciya-v-ukrayini-stanom-na-zhovten-2015-roku>

361. ucab.ua/.../krugliy_stil_epizootichna_situatsiya_v_ukraini_ta_neobkhidni_vitrati_dlya_zabezpechennya_ii_stabilnosti_2510/

362. Головка В. О. Вивчення властивостей виробничого штаму *M. bovis Vallee* КМІЭВ 9КМ / 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.

363. 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.

364. Кассіч В. Ю. Алергічна діагностика зоонозів та засоби для її проведення / В. Ю. Кассіч, А. Г. Левченко, В. Д. Івченко, О. В. Кассіч, В. О. Головка // Вісник Сумського національного аграрного університету. – 2016. – Вип. 1 (40),. – С. 164–169.

365. Кассіч В. Ю. Аналіз та впровадження режимів стерилізації виробничих штамів мікобактерій / В. Ю. Кассіч, А. Г. Левченко, О. В. Кассіч // Вісник Сумського НАУ. – 2017. – Вип. 11 (41). – С. 86–90.

366. Кассіч В. Ю. Радіаційна стерилізація мікобактерій / В. Ю. Кассіч, Т. І. Фотіна, М. Д. Камбур, О. В. Кассіч // Вісник Сумського НАУ. – 2010. – Вип. 8 (27). – С. 44–49.

367. Головка В. О. Збудники туберкульозу і атипові мікобактерії, їх ультраструктура, диференціація та епізоотологічне значення / В. О. Головка, О. В. Кассіч, В. Ю. Кассіч, А. Г. Левченко // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. Збірник наукових праць. – Харків, 2016. – Випуск 33, ч. 2 «Ветеринарні науки». – С. 95–101.

368. Кассіч О. В. Алергічні дослідження на туберкульоз великої рогатої худоби та мурчаків з використанням препарату «ППД-туберкулін для ссавців очищений» / О. В. Кассіч, А. Г. Левченко, В. Ю. Кассіч // Вісник Сумського НАУ. – Серія «Ветеринарна медицина». – 2017. – Вип. 1 (42). – С. 276–281.

369. Кассич А. В. Изменчивость облученных микобактерий / А. В. Кассич, А. Г. Левченко, В. Ю. Кассич // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» (январь-июнь). – 2016. Том 52, Вып. 1. – С. 38–42.

370. Левченко А. Г. Модифицированная методика подготовки производственного штамма *M. bovis* «Vallee» КМИЭВ–9 КМ для исследований растровым электронным микроскопом / А. Г. Левченко, А. В. Кассич // Учреждение образования «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия». – Молодежь и инновации – 2017 В двух частях. – 2017. – Часть 2. – С. 105–107.

371. Кассіч В. Ю. Дослідження впливу опромінення на ультраструктуру та мінливість мікобактерій // В. Ю. Кассіч, А. Г. Левченко, Ю. А. Байдевятов, Г. І. Ребенко, В. О. Головка, О. В. Кассіч, В. О. Ушкалов, О. В. Волосянко // *Scientific Journal «Science Rise»*. Ветеринарні науки. – 2017. – № 11 (40). – С. 6–14.

372. Головка В. О. Продукція туберкулопротейнів виробничим штамом *M. Bovis Vallee* КМИЭВ – 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.

373. Кассіч В. Ю. Дезінфекція виробничих приміщень неблагополучних щодо туберкульозу господарств з використанням препарату «Бровадез-плюс» // В. Ю. Кассіч, Т. І. Фотіна, А. В. Березовський, Г. А. Фотіна, О. В. Кассіч, І. П. Полоз, О. А. Власенко // Вісник Сумського НАУ. – 2010. – вип. 8 (27). – С. 44–49.

374. 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.

375. Патент на корисну модель «Виробничий штам *M. Bovis Vallee* КМІЕВ-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.

376. Патент на корисну модель 63246 U, МПК С12N 1/20, С 12R 1/32. Від 10.10.2011, Бюл. №19 «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.

377. Патент на корисну модель за № 111052, від 25.10.2016 року, виданого згідно заявки № u201605232 «Синтетичне живильне середовище Сотона-ХБ для прискореного росту мікобактерій при виготовленні туберкуліну». Розробники: В. Ю. Кассіч, О. В. Кассіч, К. Ю. Колеснікова, В. Г. Кошельник, Т. О. Терпецька.

378. Патент на корисну модель за № 108460 від 25.07.2016 згідно заявки № а201509959 «Спосіб визначення активності очищеного (ППД) туберкуліну для ссавців на тваринах, сенсibilізованих авірулентними культурами *M. bovis*». Розробники: В. Ю. Кассіч, О. В. Кассіч, К. Ю. Колеснікова, В. Г. Кошельник, Т. О. Терпецька.

379. Патент на корисну модель за № 114777, від 27.03.2017 року, виданий згідно заявки № u201604892 «Спосіб отримання туберкуліну з культуральної рідини та бактеріальної маси мікобактерій» Розробники: В. Ю. Кассіч, О. В. Кассіч, К. Ю. Колеснікова, В. Г. Кошельник, Т. О. Терпецька.

380. Патент на корисну модель за № 120698 від 10.11.2017 згідно заявки u 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.

ДОДАТКИ

Додаток А

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Кассіч В. Ю. Радіаційна стерилізація мікобактерій / В. Ю. Кассіч, Т. І. Фотіна, М. Д. Камбур, **О. В. Кассіч** // Вісник Сумського НАУ. – 2010. – Вип. 8 (27). – С. 44–49.
2. Головка В. О. Збудники туберкульозу і атипові мікобактерії, їх ультраструктура, диференціація та епізоотологічне значення / В. О. Головка, **О. В. Кассіч**, В. Ю. Кассіч, А. Г. Левченко // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. Збірник наукових праць. – Харків, 2016. – Випуск 33, ч. 2 «Ветеринарні науки». – С. 95–101.
3. Кассіч В. Ю. Дезінфекція виробничих приміщень неблагополучних щодо туберкульозу господарств з використанням препарату «Бровадез-плюс» // В. Ю. Кассіч, Т. І. Фотіна, А. В. Березовський, Г. А. Фотіна, **О. В. Кассіч**, І. П. Полоз, О. А. Власенко // Вісник Сумського НАУ. – 2010. – вип. 8 (27). – С. 44–49.

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

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. 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.
3. 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.

4. Кассіч В. Ю. Алергічна діагностика зоонозів та засоби для її проведення / В. Ю. Кассіч, А. Г. Левченко, В. Д. Івченко, **О. В. Кассіч**, В. О. Головка // Вісник Сумського національного аграрного університету. – 2016. – Вип. 1 (40). – С. 164–169.

5. 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.

6. Кассіч В. Ю. Аналіз та впровадження режимів стерилізації виробничих штамів мікобактерій / В. Ю. Кассіч, А. Г. Левченко, **О. В. Кассіч** // Вісник Сумського НАУ. – 2017. – Вип. 11 (41). – С. 86–90.

7. **Кассіч О. В.** Алергічні дослідження на туберкульоз великої рогатої худоби та мурчаків з використанням препарату «ППД-туберкулін для ссавців очищений» / **О. В. Кассіч**, А. Г. Левченко, В. Ю. Кассіч // Вісник Сумського НАУ. – Серія «Ветеринарна медицина». – 2017. – Вип. 1 (42). – С. 276–281.

Статті у наукових виданнях інших держав:

1. **Кассич А. В.** Изменчивость облученных микобактерий / А. В. Кассич, А. Г. Левченко, В. Ю. Кассич // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» (январь-июнь). – 2016. Том 52, Вып. 1. – С. 38–42.

2. Левченко А. Г. Модифицированная методика подготовки производственного штамма *M. bovis* «Vallee» КМИЭВ–9 КМ для исследований растровым электронным микроскопом / А. Г. Левченко, **А. В. Кассич** // Учреждение образования «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия». – Молодежь и инновации – 2017 В двух частях. – 2017. – Часть 2. – С. 105–107.

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

1. Кассіч В. Ю. Дослідження впливу опромінення на ультраструктуру та мінливість мікобактерій // В. Ю. Кассіч, А. Г. Левченко, Ю. А. Байдевятов,

Г. І. Ребенко, В. О. Головка, **О. В. Кассіч**, В. О. Ушкалов, О. В. Волосянко // *Scientific Journal «ScienceRise»*. Ветеринарні науки. – 2017. – № 11 (40). – С. 6–14.

Патенти:

1. Патент на корисну модель «Виробничий штам *M. bovis Vallee* КМІЕВ-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.

2. Патент на корисну модель 63246 U, МПК С12N 1/20, С 12R 1/32. Від 10.10.2011, Бюл. №19 «Синтетичне живильне середовище (Сотона КФ) для прискороного 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.

3. Патент на корисну модель за № 111052, від 25.10.2016 року, виданого згідно заявки № u201605232 «Синтетичне живильне середовище Сотона-ХБ для прискороного росту мікобактерій при виготовленні туберкуліну». Розробники: В. Ю. Кассіч, **О. В. Кассіч**, К. Ю. Колеснікова, В. Г. Кошельник, Т. О. Терпецька.

4. Патент на корисну модель за № 108460 від 25.07.2016 згідно заявки № а 201509959 «Спосіб визначення активності очищеного (ППД) туберкуліну для ссавців на тваринах, сенсibilізованих авірулентними культурами *M. bovis*». Розробники: В. Ю. Кассіч, **О. В. Кассіч**, К. Ю. Колеснікова, В. Г. Кошельник, Т. О. Терпецька.

5. Патент на корисну модель за № 114777, від 27.03.2017 року, виданий згідно заявки № u201604892 «Спосіб отримання туберкуліну з культуральної рідини та бактеріальної маси мікобактерій». Розробники: В. Ю. Кассіч, **О. В. Кассіч**, К. Ю. Колеснікова, В. Г. Кошельник, Т. О. Терпецька.

6. Патент на корисну модель за № 120698 від 10.11.2017 згідно заявки u 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.

ДОДАТКИ

Додаток А.1

Паспорт штаму *M. bovis Vallee KMIEB-9*



ПАСПОРТ

1.	Наименование штамма, серогруппа или номер	Mycobacterium bovis Vallee (КМИЭВ - 9)
2.	Кем, когда и от кого выделен штамм	-
3.	Из какого учреждения получен штамм и дата получения	из ВГНКИ (Москва) в 1973 году
4.	Назначение штамма	Производственный, музейный
5.	Культурально-морфологические свойства	В мазках, приготовленных из культур, выращенных на плотных яичных и жидких, синтетических питательных средах (Гельберга, Левинштейна-Йенсена, Сотоно), окрашенных по Цаль-Нильсену имеет вид палочек, размером 0,3 - 0,6 × 1,5 - 5 мкм до 10 мкм. Внутри палочки иногда просматриваются зерна. Штамм является микроаэрофилом. На МПА и МПБ не растет. Рост на яичных и картофельных средах только при 37°C. На жидких питательных средах образует корд-фактор. Колонии культур сухие, мелкие, цвета слоновой кости. Скорость роста в субкультуре 12-20 суток. На жидкой питательной среде образует крошковатую пленку, без помутнения среды.
6.	Ферментативные свойства	Твин 80 не гидролизует, нитратредуктазная реакция отрицательная
7.	Серологические свойства	В перекрестном иммуноэлектрофорезе с референс-сывороткой M.bovis №8 образует 12-15 преципитатов, идентичных преципитатам антигенов M.bovis №8.
9.	Патогенность	Штамм умеренно патогенен для крупного рогатого скота, морских свинок и кроликов. При подкожном заражении в дозе 1 мг на морскую свинку 50-70, у животных развиваются признаки туберкулеза с поражением печени и легких, часть животных гибнет в течение 3-х месяцев
10.	Вирулентность (LD ₅₀ для белых мышей)	-
11.	Условия хранения	При температуре 2-5 °C на полужидком МПА под вазелиновым маслом, при -86 оC с добавлением криопротекторов, в лиофилизированном состоянии
12.	Периодичность пересевов или лиофилизации	Хранят при +2...+4°C после лиофильного высушивания в глютамате натрия в течение 5 лет, в течение 2-3 лет на плотных питательных средах при температуре -16...-18°C, а также в течении 4-6 месяцев при температуре +37...+38°C. Жизнеспособность его поддерживается путем пересева на питательные среды (Гельберга, Левинштейна-Йенсена) 2 раза в год при условии хранения при +37... +38°C.
13.	В каком виде пересылается штамм, количество пробирок, ампул	В лиофильно высушенном состоянии, 2 пенфлакона
14.	Дополнительные сведения о штамме	Дает положительную реакцию в ПЦР с использованием праймеров 6.110

Заведующий лабораторией диагностики и коллекцией микроорганизмов отдела эпизоотологического и иммунологического мониторинга



Ю.В.Ломако

Додаток Б

Свідоцтво про первісне депонування штаму мікроорганізмів
M. bovis Vallee KMIEB-9 в Депозитарії ДНКІБШМ за № 538 від 03.03.2011

СВІДОЦТВО

про первісне депонування штаму мікроорганізму
в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і
штамів мікроорганізмів

Кому видано: Державному науково-контрольному інституту біотехнології і
штамів мікроорганізмів (Ушкалов В. О., Кассіч В. Ю., Кассіч О. В.,
Мачуський О. В.)

03151, м. Київ, вул. Донецька, 30

Цим підтверджується, що штам мікроорганізму **Mycobacterium bovis Valle
KMIEB-9** первісно депонований в Депозитарії Державного науково-
контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм: **538**

Супроводжувальна документація від депозитора одержана: паспорт, акт,
методика

Дата первісного депонування: 03.03.2011 року

Депозитарій Державного науково-контрольного інституту біотехнології і
штамів мікроорганізмів

Адреса: 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30



03.03.2011 року

В. О. Ушкалов

Додаток В

Свідоцтво про первинне депонування штаму мікроорганізмів

M. bovis Vallee KMIEB-9KM в Депозитарії ДНКІБШІМ за № 539 від 03.03.2011

СВІДОЦТВО

про первісне депонування штаму мікроорганізму
в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і
штамів мікроорганізмів

Кому видано: Державному науково-контрольному інституту біотехнології і
штамів мікроорганізмів (Ушкалов В. О., Кассіч В. Ю., Кассіч О. В.,
Мачуський О. В.)

03151, м. Київ, вул. Донецька, 30

Цим підтверджується, що штам мікроорганізму **Mycobacterium bovis Valle
KMIEB-9KM** первісно депонований в Депозитарії Державного науково-
контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів

Регістраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм: **539**

Супроводжувальна документація від депозитора одержана: паспорт, акт,
методика

Дата первісного депонування: 03.03.2011 року

Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і
штамів мікроорганізмів

Адреса: 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30



03.03.2011 року

В. О. Ушкалов

Додаток Г

Патент на корисну модель «Виробничий штам *M. bovis Vallee* (KMIEB-9KM) для виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців» за № 109231



Додаток Д

Патент на корисну модель 63246 U «Синтетичне живильне середовище (Сотона КФ) для прискореного накопичення бактеріальної маси мікобактерій»



(11) 63246

(19) UA

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/32 (2006.01)

(21) Номер заявки: u 2010 14606

(22) Дата подання заявки: 06.12.2010

(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.10.2011

(46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: 10.10.2011, Бюл. № 19

(72) Винахідники:

Кассіч Володимир
Юрійович, UA,
Фотіна Тетяна Іванівна, UA,
Фотіна Ганна Анатоліївна,
UA,
Дзюба Володимир
Миколайович, UA,
Кассіч Олексій
Володимирович, IN,
Полоз Ірина Миколаївна, IN

(73) Власник:

СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Кірова, 160, м. Суми,
40021, UA

(54) Назва корисної моделі:

СИНТЕТИЧНЕ ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ (СОТОНА КФ) ДЛЯ ПРИСКОРЕННОГО
НАКОПИЧЕННЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ МАСИ МІКОБАКТЕРІЙ

(57) Формула корисної моделі:

Синтетичне живильне середовище для прискореного накопичення бактеріальної маси мікобактерій, яке містить: L-аспаратин ($C_4H_7NO_3 \cdot H_2O$), калій фосфорнокислий двоаміщений (K_2HPO_4), магній сірчанокислий ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), лимонну кислоту ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), гліцерин ($C_3H_8O_3$), воду дистильовану, підігріту до температури 70 °C, яке відрізняється тим, що додатково містить залізо сірчанокисле ($FeSO_4$), амоній лимоннокислий двоаміщений ($C_6H_{14}O_7N_2$), харчову яблучну кислоту ($C_4H_6O_5$) та цинк сірчанокислий ($ZnSO_4$), у такому співвідношенні компонентів, (г):

L-аспаратин ($C_4H_7NO_3 \cdot H_2O$)
калій фосфорнокислий двоаміщений (K_2HPO_4)
магній сірчанокислий ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
лимонна кислота ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)
харчова яблучна кислота ($C_4H_6O_5$)
цинк сірчанокислий ($ZnSO_4$)
амоній лимоннокислий двоаміщений ($C_6H_{14}O_7N_2$)
залізо сірчанокисле ($FeSO_4$)
гліцерин ($C_3H_8O_3$)
вода дистильована підігріта до температури 70 °C

5,0
0,5
0,5
2,0
1,0
0,1
2,0
0,05
50,0
до 1 л.



Додаток Ж

Патент на корисну модель за № 111052, від 25.10.2016 року, виданого згідно заявки № u201605232 «Синтетичне живильне середовище Сотона-ХБ для прискореного росту мікобактерій при виготовленні туберкуліну»



(11) 111052

(19) UA

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/32 (2006.01)

- (21) Номер заявки: **u 2016 05232**
- (22) Дата подання заявки: **13.05.2016**
- (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.10.2016**
- (46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: **25.10.2016, Бюл. № 20**

(72) Винахідники:
Кассіч Володимир Юрійович, UA,
Кассіч Олексій Володимирович, UA,
Кошельник Василь Гаврилович, UA,
Колеснікова Катерина Юрійовна, UA,
Терпецька Тетяна Олександрівна, UA

(73) Власники:
Кассіч Володимир Юрійович,
 вул. Г. Кондратьєва, 160/5, кв. 109, м. Суми, 40021, UA,
Кассіч Олексій Володимирович,
 в/д Кірова, 8, м. Люботин, Харківська обл., 62433, UA,
Кошельник Василь Гаврилович,
 просп. 200 років Херсону, 33, кв. 22, м. Херсон, 73000, UA,
Колеснікова Катерина Юрійовна,
 пров. Пугачева, 6, кв. 16, м. Херсон, 73000, UA,
Терпецька Тетяна Олександрівна,
 вул. Адмірала Макарова, 9, м. Херсон, 73011, UA

(54) Назва корисної моделі:

СИНТЕТИЧНЕ ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ СОТОНА-ХБ ДЛЯ ПРИСКОРЕНОГО РОСТУ МІКОБАКТЕРІЙ ПРИ ВИГОТОВЛЕННІ ТУБЕРКУЛІНУ

(57) Формула корисної моделі:

Синтетичне живильне середовище для прискореного росту та накопичення бактеріальної маси мікобактерій, яке має заліза амонійного цитрат, L-Аспарагін ($C_4H_7NO_3 \cdot H_2O$), лимонну кислоту ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), магнезію сульфат ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), калію гідрофосфат (K_2HPO_4), натрію дигідрофосфат, натрію хлорид ($NaCl$), твін-80, яке відрізняється тим, що додатково містить ростові фактори - вітамін B1 і вітамін B12, що призводять до прискорення росту та накопичення на ньому бактеріальної маси мікобактерій, при наступному складі:

Інгредієнти	грам/літр
Заліза амонійного цитрат	0,0167
L-Аспарагін ($C_4H_7NO_3 \cdot H_2O$)	1,330
Лимонна кислота ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	0,660

Додаток К

Патент на корисну модель № 114777 (за заявкою № u201604892)

«Спосіб отримання туберкуліну з культуральної рідини та бактеріальної маси
мікобактерій»



(11) 114777

(19) UA

(51) МПК
A61K 39/35 (2006.01)

(21) Номер заявки: **u 2016 04892**
 (22) Дата подання заявки: **04.05.2016**
 (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **27.03.2017**
 (46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: **27.03.2017, Бюл. № 6**

(72) Винахідники:
Кассіч Володимир Юрійович, UA,
Кассіч Олексій Володимирович, UA,
Кошельник Василь Гаврилович, UA,
Колеснікова Катерина Юрійовна, UA,
Терпецька Тетяна Олександрівна, UA

(73) Власники:
Кассіч Володимир Юрійович,
 вул. Г. Кондратьєва, 160/5, кв. 109, м. Суми, 40021, UA,
Кассіч Олексій Володимирович,
 в/д Кірова, 8, м. Люботин, Харківська обл., 62433, UA,
Кошельник Василь Гаврилович,
 просп. 200 років Херсону, 33, кв. 22, м. Херсон, 73000, UA,
Колеснікова Катерина Юрійовна,
 пров. Пугачова, 6, кв. 16, м. Херсон, 73000, UA,
Терпецька Тетяна Олександрівна,
 вул. Адмірала Макарова, 9, м. Херсон, 73011, UA

(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ ОТРИМАННЯ ТУБЕРКУЛІНУ З КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ ТА БАКТЕРІАЛЬНОЇ МАСИ МІКОБАКТЕРІЙ

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб отримання туберкуліну з культуральної рідини та бактеріальної маси мікобактерій, який полягає в тому, що після накопичення та інактивації бактеріальної маси мікобактерій на синтетичному живильному середовищі Сотона туберкулін отримують комплексно: із культурального фільтрату та із бактеріальної маси мікобактерій, озвученої на ультразвуковому диспергаторі при частоті ультразвуку 22 кГц та інтенсивності 90, 100, 110 Вт/см² при триразовій обробці з інтервалами три хвилини, який відрізняється тим, що отримані із культурального фільтрату та із бактеріальної маси мікобактерій препарати використовують для виготовлення очищеного (ПГД) туберкуліну шляхом їх змішування у співвідношенні 1:10, за рахунок чого вихід туберкуліну збільшується у 10 разів.

Додаток Л

Патент на корисну модель № 120698 (за заявкою и 2017 08588, дата подання 12.06.2017) «Спосіб виготовлення ППД-туберкуліну з використанням методів мікрофільтрації та ультрацентрифугування»



Додаток М

Патент на корисну модель за № 108460 від 25.07.2016 згідно заявки
№ а201509959 «Спосіб визначення активності очищеного (ППД)
туберкуліну для ссавців на тваринах, сенсibilізованих авірулентними
культурами *M. bovis*».





ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108460** (13) **U**
(51) МПК
A61K 39/04 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **а 2015 09959**
(22) Дата подання заявки: **12.10.2015**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.07.2016**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.07.2016, Бюл.№ 14**

(72) Винахідник(и):
**Кассіч Володимир Юрійович (UA),
Кассіч Олексій Володимирович (UA),
Кошельник Василь Гаврилович (UA),
Колеснікова Катерина Юрійовна (UA)**
(73) Власник(и):
**Кассіч Володимир Юрійович,
вул. Г. Кондратьєва, 160/5, кв. 109, м. Суми,
40021 (UA),
Кассіч Олексій Володимирович,
в/д Кірова, 8, м. Люботин, Харківська обл.,
62433 (UA),
Кошельник Василь Гаврилович,
пр. 200 років Херсону, 33, кв. 22, м. Херсон,
73000 (UA),
Колеснікова Катерина Юрійовна,
пров. Пугачова, 6, кв. 16, м. Херсон, 73000
(UA)**

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ОЧИЩЕНОГО (ППД) ТУБЕРКУЛІНУ ДЛЯ ССАВЦІВ НА ТВАРИНАХ, СЕНСІБІЛІЗОВАНИХ АВІРУЛЕНТНИМИ КУЛЬТУРАМИ *M.bovis*

(57) Реферат:

Спосіб визначення активності очищеного (ППД) туберкуліну для ссавців на тваринах, сенсифілізованих авірулентними культурами *M.bovis*, включає отримання суспензії, що містить 1-5 мг культури мікобактерій, сенсифілізацію нею морських свинок і великої рогатої худоби та використання сенсифілізованих тварин для визначення активності туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців у стандартному розчині. При цьому для сенсифілізації тварин використовують непатогенний, авірулентний (інактивований) біологічний матеріал, що запобігає розповсюдженню вірулентних мікобактерій в довкіллі.

UA 108460 U

Додаток Н

Акт

впровадження авторських розробок
у виробництво на Херсонському державному підприємстві —
біологічна фабрика

ЗАТВЕРДЖУЮ:

В.о. директора Херсонського
Державного підприємства –
біологічна фабрика Терпецька Т.О.
«___» _____ 2016 р.

АКТ

впровадження у виробництво на Херсонському Державному підприємстві
біологічна фабрика наукових розробок

Ми, що нижче підписалися, зам.директора ХДП - біологічна фабрика по загальним питанням Кошельник В.Г., начальник цеху з виробництва біопрепаратів Колеснікова К.Ю., в.о. завідувача відділу бактеріологічного контролю Костенко І.Є., склали цей акт у тому, що впродовж 2015-2016 р.р. на Херсонському Державному підприємстві - біологічна фабрика розроблено та впроваджено у виробництво наукові розробки авторського колективу в складі професора Кассіча В.Ю., аспіранта ХДЗБА Кассіча О.В., співробітників Херсонської біофабрики кандидата ветеринарних наук Колесникової К.Ю., Кошельника В.Г., Терпецької Т.О., а саме: «Виробничий штам *M.bovis* Valle (KMIEB-9KM) для виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців», «Синтетичне живильне середовище Сотона-ХБ для прискореного росту мікобактерій», «Спосіб отримання туберкуліну з культуральної рідини та бактеріальної маси мікобактерій», «Спосіб визначення активності очищеного (ППД) туберкуліну для ссавців на тваринах, сенсibilізованих авірулентними культурами *M.bovis*», «Спосіб виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців з використанням методу мікрофільтрації та ультрацентрифугування». Означені розробки оформлені як заявки на винахід (корисну модель), направлені для розгляду в ДП «Український інститут промислової власності» (м.Київ, вул.Глазунова, 1), увійшли до технологічного регламенту виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців, взяті за основу при складанні Дос'є на препарат і використовуються в його виробництві, в чому і складено цей акт.

Зам.директора по загальним питанням:

 Кошельник В.Г.

Начальник цеху з виробництва біопрепаратів:

 Колеснікова К.Ю.

В.о. завідувача відділу бактеріологічного контролю:

 Костенко І.Є.

Додаток П

Титульний лист Інструкції з виготовлення препарата «ППД-туберкулін
для ссавців очищений»

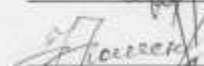
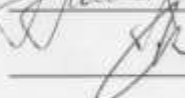
УКРАЇНА
МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ ТА ПРОДОВОЛЬСТВА

УЗГОДЖЕНО:
Директор ДНКІБШМ
доктор вет. наук, професор,
академік НААНУ
Головко А.М.
.....20 р.

ЗАТВЕРДЖУЮ:
Директор Державного підприємства
Херсонська біологічна фабрика
Кошельник В.Г.
".....".....20 р.

**ІНСТРУКЦІЯ
ПО ВИГОТОВЛЕННЮ І КОНТРОЛЮ ТУБЕРКУЛІНУ
ОЧИЩЕНОГО (ППД) ДЛЯ ССАВЦІВ У СТАНДАРТНОМУ
РОЗЧИНІ**

1

РОЗРОБНИКИ:
Кассіч В.Ю.
Кошельник В.Г.
Колеснікова К.Ю.
Кассіч О.Ю.

Додаток Р

Акти

впровадження матеріалів дисертаційної роботи в навчальний процес на факультетах ветеринарної медицини при викладенні дисциплін «Епізоотологія», «Інфекційні хвороби», «Мікробіологія», «Біотехнологія ветеринарних імунобіологічних препаратів», «Імунологія»

Затверджую:

Перший проректор, Львівського
національного університету ветеринарної
медицини та біотехнологій імені С. З.
Гжицького,
доцент
«04» березня 2018 р.

Турко І.Б.



Довідка
про впровадження матеріалів
кандидатської дисертаційної роботи у навчальний процес

Даною довідкою стверджується, що матеріали дисертаційної роботи **Касіча** Олексія Володимировича на тему: «Теоретичне, практичне обґрунтування розробка препарату «ППД-туберкулін для ссавців очищений» із використанням методів мікрофільтрації та ультрацентрифугування», що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.03-«Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія». Дані матеріали впроваджено у навчальний процес при викладенні дисциплін «Ветеринарна мікробіологія», «Епізоотологія», «Інфекційні хвороби» та «Імунологія» стосовно, технології виготовлення та використання для алергічних досліджень ветеринарних імунобіологічних препаратів. Зокрема препарат «ППД-туберкулін для ссавців очищений» застосовується на кафедрі епізоотології у Львівському національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, при підготовці фахівців ОР «Бакалавр» зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» протокол № 3 від 03 березня 2018 р.

Декан факультету ветеринарної медицини,
кандидат ветеринарних наук, доцент



Стронський Ю.С.

Завідувач кафедри епізоотології,
доктор ветеринарних наук, доцент

Куртяк Б.М.

Затверджую:

Перший проректор – проректор
з навчальної роботи

«10» _____ 2018 р.
Д.М. Онопріснко
Дніпровський державний аграрно-економічний університет
00493675

А К Т

про впровадження матеріалів кандидатської дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що матеріали дисертаційної роботи Кассіча Олексія Володимировича на тему: «Теоретичне, практичне обґрунтування розробка препарату «ППД-туберкулін для ссавців очищений» з використанням методів мікрофільтрації та ультрацентрифугування», що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.03-«Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія», впроваджено у навчальний процес при викладанні дисциплін «Ветеринарна мікробіологія», «Епізоотологія», «Інфекційні хвороби» та «Імунологія» стосовно, технології виготовлення та використання для алергічних досліджень ветеринарних імунобіологічних препаратів, зокрема препарату «ППД-туберкулін для ссавців очищений» на кафедрі епізоотології та інфекційних хвороб тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету, при підготовці фахівців ОР «Бакалавр», «Магістр» зі спеціальності 212 «Ветеринарна медицина» протокол № 6 від 27 лютого 2018 р.

Завідувач кафедри епізоотології та інфекційних
хвороб тварин ДДАЕУ,
д. вет. н., професор

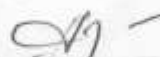
 Ткаченко О.А.

Погоджено:

Затверджую:

Проректор з науково-педагогічної роботи та міжнародних зв'язків,
к.філ. н., доцент

Перший проректор,
к. с. н., доцент

 О. А. Коваленко



 О. С. Малашук

« 15 » 03 2018 р.

« 15 » 03 2018 р.

А К Т

про впровадження результатів
кандидатської дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи Кассіча Олексія Володимировича на тему: «Теоретичне, практичне обґрунтування розробка препарату «ППД-туберкулін для ссавців очищений» з використанням методів мікрофільтрації та ультрацентрифугування», що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія», впроваджено у навчальну програму при викладенні дисциплін «Ветеринарна мікробіологія», «Епізоотологія», «Інфекційні хвороби та імунологія» стосовно теоретичного, практичного обґрунтування, розробки та впровадження у виробництво препарату «ППД-туберкулін для ссавців очищений» на кафедрі епізоотології та паразитології у Одеському державному аграрному університеті, при підготовці фахівців ОР «Бакалавр», ОР «Магістр» зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» протокол № 9 від 13 лютого 2018 р.

Завідувач кафедри
епізоотології та паразитології,
к. вет. н., доцент



О. Г. Гуменний

Декан факультету ветеринарної
медицини та біотехнологій, к.с./г.н., доцент



В. О. Чигирьов

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор
Одеського державного аграрного
університету
к. е. н., доцент

О. С. Малашук

« 15 » 12 2018 р.

КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

1. Викладені в інформаційному листі аспіранта Кассіча Олексія Володимировича матеріали його дисертаційної роботи на здобуття вченого ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія» на тему: «Теоретичне, практичне обґрунтування та розробка препарату «ППД-туберкулін для ссавців очищений» з використанням методів мікрофільтрації і ультрацентрифугування» використовується у навчальному процесі та науково-дослідній роботі кафедри епізоотології та паразитології факультету ветеринарної медицини та біотехнологій.
2. Матеріали розглянуто і схвалено на засіданні кафедри епізоотології та паразитології (Протокол № 9 від 23 лютого 2018 р.) та на засіданні методичної ради факультету ветеринарної медицини та біотехнологій Одеського державного аграрного університету (Протокол № 6 від 27 лютого 2018 р.).

Завідувач кафедри
епізоотології та паразитології,
к. вет. н., доцент



О. Г. Гуменний