

В.О. Головка, д.вет.н., професор, академік НААН України

О.В. Кассіч, аспірант, Харківська державна зооветеринарна академія

В.Ю. Кассіч, д.вет.н., професор, Сумський національний аграрний університет

К.Ю. Колеснікова, к.вет.н.

В. Г. Кошельнік, лікар ветеринарної медицини, ДП Херсонська біологічна фабрика

Згідно вимог стандарту ЕС, PPD-туберкулін для ссавців виготовляється зі штамів *M. bovis* «AN5» або «Valle», в той час як для виготовлення вітчизняного препарату (ТУУ 24.00497087.645-2001) використовують виробничий штам «*M. bovis* ІЕКВМ-1». Тому розробка вітчизняного PPD-туберкуліну із штаму *M. bovis* «Valle» є актуальним завданням. Досліджені нами штами мікобактерій бичачого виду *M. bovis* Valle КМІЕВ-9 та КМІЕВ-9КМ мають характерні морфологічні, біологічні, культуральні та біохімічні властивості і являються високопротеїногенним, що робить їх перспективними при виробництві ППД-туберкуліну для ссавців.

Ключові слова: туберкульоз, туберкулін, мікобактерії *M. bovis* Valle.

Постановка проблеми у загальному вигляді та аналіз досліджень і публікацій. Ефективна боротьба з туберкульозом тварин можлива лише при всебічному вивченні епізоотології хвороби, біології збудника, патогенезу, методів профілактики, економічних і екологічних факторів, які впливають на перебіг хвороби за умов забезпечення тваринництва ефективними засобами специфічної діагностики. Головним методом прижиттєвого дослідження тварин на туберкульоз є внутрішньо шкірна алергічна проба із застосуванням ППД-туберкуліну для ссавців. Препарати для алергічної діагностики туберкульозу тварин і птиці «Туберкулін очищений (ППД) для ссавців в стандартному розчині» (ТУУ 24.00497087.645-2001), ППД-туберкулін для птиці (ТУУ 24.4.00497087-675-2002) та алерген з атипичних мікобактерій (ААМ) (ТУУ 24.400497087-697-2003) розроблені в ННЦ ІЕКВМ колективом авторів (Кассіч Ю.Я., Завгородній А.І., Кассіч В.Ю. та ін.) [3,6,7,15,16], впроваджені у виробництво, виготовляються Сумською біологічною фабрикою і забезпечують проведення планових діагностичних досліджень на туберкульоз на території України [3, 6, 7].

Важливим законодавчим актом країн Європейського співтовариства є Директива Ради ЄС за номером 97/12/ЄС від 17 березня 1997р., яка вносить зміни і модернізує Директиву № 64/432/ЄС [12]. У відповідності з цими документами туберкулінізацію тварин проводять з використанням туберкулінів PPD (Proteinpurified derivative) або HCSM (Heat-concentrated synthetic medium tuberculin). При цьому ППД-туберкулін виготовляють із вирощених на рідкому синтетичному живильному середовищі Сотона виробничих штамів *M. bovis* «AN5» або «Valle» шляхом стерилізації культур автоклавуванням, відокремлення бактеріальної маси, одержання й стерилізації культуральних фільтратів (стерилізуюча фільтрація), осадження протеїну розчином трихлороцтової кислоти, переосадження його насиченим розчином сірчанокислого амонію, очищення від солей за допомогою діалізу з подальшим визначенням концентрації протеїну в 1 см³ розчину [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11,12].

Згідно стандарту ЕС, що надає Insti-

tutevoor Dierhouderijen Diergezondheid (ID-DLO), Lelystad, The Netherlands, PPD-туберкулін для ссавців повинен мати ефективність 50 000 ЕСТ/мл та випускатися в ліофілізованому вигляді в ампулах по 1,8 мг PPD (тобто 0,0002 мг PPD еквівалентні одній міжнародній одиниці туберкуліну). Препарат повинен виготовлятися зі штамів *M. Bovis* «AN5» або «Valle» [12], в той час як при виготовленні «Туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців в стандартному розчині» ТУУ 24.00497087.645-2001, виробничим штамом є «*M. bovis* ІЕКВМ-1» [3, 7, 12]. Тому розробка вітчизняного сухого очищеного PPD- та HCSM-туберкуліну з штамів *M. bovis* «Valle» є актуальним завданням [7, 12].

Мета роботи. Основою ветеринарних біологічних імунопрепаратів є виробничий штам. Тому метою нашої роботи було вивчення біологічних властивостей виробничого штаму *M. bovis* Valle КМІЕВ-9, одержаного з Білоруського науково-дослідного Інституту експериментальної ветеринарії ім. Вишелеського та його модифікату, виділеного нами шляхом селекції на синтетичних поживних середовищах, який отримав назву: «виробничий штам *M. bovis* Valle КМІЕВ-9КМ».

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом для досліджень були мікобактерії штамів Valle КМІЕВ-9 та виробничого штаму *M. bovis* Valle КМІЕВ-9КМ. Дослідження проводили з використанням світлової та електронної мікроскопії, біохімічними, біологічними, молекулярно-генетичними методами. Молекулярно-генетичні, біологічні, морфологічні, культуральні та біохімічні дослідження та перекресний імуноелектрофорез проводили на базі ДНКІБШМ, Білоруського науково-дослідного Інституту експериментальної ветеринарії та Херсонської біологічної фабрики. Геномну ДНК з культур мікобактерій виділяли методом фенол-хлороформної екстракції.

Для електронно-мікроскопічного дослідження на базі лабораторії електронної мікроскопії Сумського НАУ та Інституту невідкладної хірургії (м. Харків) препарати (культури мікобактерій на живильних середовищах) фіксували у 1 % забуференому розчині чотирьохоксику осмію про-

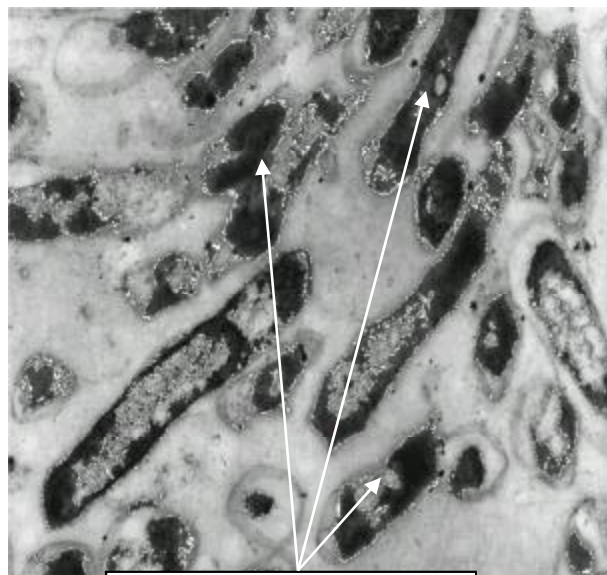
тягом 2-3 годин при температурі 4°C. Після фіксації бактеріальні клітини відмивали у буферному розчині, дегідрували у спиртах зростаючої концентрації та ацетоні та вносили у суміш епоксидних смол (епон-аралдіт). Полімеризацію білків здійснювали у термостаті при температурі 60°C протягом двох діб. Ультратонкі зрізи готували на ультратомі УМТП-6 та після контрастування цитратом свинцю вивчали під електронним мікроскопом ЕМВ-100 БР з прискорюючою напругою 75 кВт. Збільшення підбиралось адекватно меті дослідження. Культурально-морфологічні та біологічні дослідження проводили за стандартними методиками.

Результати власних досліджень, їх аналіз та обговорення. Мікобактерії штаму *M.bovis*Valle КМІЄВ-9 та виробничого штаму *M.bovis*Valle КМІЄВ-9КМ є спиртокислотостійкими мікроорганізми, за Цілем-Нільсеном фарбуються в червоний колір, джгутів не мають; капсул та спор не утворюють.

В мазках, виготовлених з культур, вирощених на щільних та рідких синтетичних та елективних живильних середовищах: Гельберга, Левенштейна-Ієнсена, синтетичному живильному середовищі (Сотона КФ) для прискореного накопичення бактеріальної маси (Патент Укр.№63245; розробники Кассіч В.Ю., Фотіна Т.І., Кассіч О.В. з співавт.) [10], пофарбованих за Ціль-Нільсеном мікобактерії мають вигляд паличок, розміром 0,3-0,6 x 1,5 мкм (до 10 мкм). В середині паличок інколи помітні зерна та гранули. На МПА та МПБ мікобактерії штаму Valle не культивуються (ріст відсутній). Проте, за температури 37°C мікроорганізми штамів, що вивчаються, дають характерний ріст у вигляді білого або кремового кольору колоній у R- або S-формі (в подальшому колонії зливаються, утримують суцільну плівку) на поверхні твердих елективних яєчних та картопляних поживних середовищ. На поверхні рідких синтетичних живильних середовищ Сотона різних модифікацій мікобактерії ростуть у вигляді щільної поверхневої плівки з петлями та виростами. Початок росту мікобактерій спостерігали на 12-18 (рідше на 15-60) добу культивування.

При вивченні препаратів *M.bovis* штаму Valle з середовища Павловського та Левенштейна-Ієнсена відзначали, що мікобактерії бичачого виду мають вигляд прямих або дещо зігнутих коротких або помірно довгих овоїдних паличок з заокругленими кінцями (рис. 1).

Відзначається значний поліморфізм культур, який залежить від терміну вирощування та середовища культивування. В середині клітин помітно зернистість (зерна Муха). Великі зерна розташовані, як правило, ближче до полюсів клітини. Крім того, в цитоплазмі деяких клітин помітні мікрогранули та вакуолі. Окремі мікрогранули в деяких випадках утворюють макрогранули, які досягають по розміру діаметру бактеріальних клітин, внаслідок чого утворюється нерівна поверхня останніх.



Зерна, гранули та вакуолі

Рис. 1. Мікобактерії штаму *M.bovis*Valle (КМІЄВ-9КМ). В препараті переважають подовжені паличкоподібні мікроорганізми на різних стадіях поділу. Збільшення: 24000 X2,4. (Фото авторів).

На поверхні деяких клітинкрім оболонки можна розрізнити фрагменти мікрокапсули. У окремих клітин помітна багатошарова структура оболонки (мікрокапсула, клітинна стінка, цитоплазматична мембрана). Окремі зерна Муха лежать зовні мікробних клітин. В деяких препаратах помітні клітини з перетяжками та міжклітинними ретикулярними тяжами.

Культивуються досліджені штами мікобактерій в аеробних умовах на елективних живильних середовищах:Петран'яні, Гельберга, Левенштейна-Ієнсена, Фінн-2, ФАСТ-ЗЛ, Павловського, Сотона та інших. Ростуть мікобактерії *M.bovis*Valle дуже повільно: впродовж 12-18 (інколи 20-60) діб. В процесі адаптації штаму *M.bovis* КМІЄВ-9КМ до розробленого нами виробничого синтетичного поживного середовища Сотона-КФ швидкість росту його вдалося підвищити практично у двічі, що трактується як наслідок фенотипової неспадкоємної мінливості. Таке прискорення росту є корисним при використанні штаму в якості виробничого при виготовленні ППД-туберкуліну для ссавців.

На живильних середовищах *M.bovis* Valle КМІЄВ-9КМ ростуть у вигляді гладеньких (S-форма) та(або) шорстких крихкуватих (R-форма) матових колоній або скупчень, а також у вигляді зморшкуватого нальоту білого, кремового, або біло-жовтого кольору (суцільний ріст).

На рідких живильних середовищах *M.bovis* Valle КМІЄВ-9КМ утворюють кришкувату плівку, без помутніння середовища. Швидкість росту в субкультурі 10-20 діб.

Твін 80 не гідролізують, нітроредуктазна реакція негативна. В перехресному імуоелектрофорезі з референс-сироваткою *M.bovis* №8 утворюють 12-15 преципітатів, ідентичних преципітатам антигенів *M.bovis* № 8 Штами дають позитивну

реакцію в ПЛР з використанням праймерів 6110 (дослідження проведені на базі Біл.НДІЕВ).

Досліджувані штами є помірно патогенними для морських свинок та кролів. 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 3 місяців з картиною генералізованого туберкульозу.

В подальшому культивування бактеріальної маси мікобактерій досліджуваних штамів та одержання очищеного протеїну проводили методами, передбаченим «Інструкцією по виготовленню і контролю туберкуліну очищеного (ППД) у стандар-

тному розчині» (розробники Кассіч Ю.Я., Завгородній А.І., Кассіч В.Ю. та ін.) на середовищі Сотона [13, 14, 15, 16]. Результати проведених досліджень патентуються і свідчать що штами *M.bovis* Valle KMIEB-9 та KMIEB-9KM є високопротеїногенними і перспективними при виробництві ППД-туберкуліну для ссавців.

Висновки і перспективи подальших досліджень. Досліджені нами штами мікобактерій бичачого виду *M.bovis* Valle KMIEB-9 та KMIEB-9KM мають характерні морфологічні, біологічні, культуральні та біохімічні властивості і являються високопротеїногенним, що робить їх перспективними при виробництві ППД-туберкуліну для ссавців.

Список використаної літератури:

1. 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.
2. Туберкулез животных и меры борьбы с ним / [Кассич Ю.Я., Борзяк А.Т., Кочмарский А.Ф. и др.]; Под ред. Ю.Я. Кассича. – Киев: "Урожай", 1990. – 304 с.
3. Кассіч В.Ю. Мінливість мікобактерій, епізоотологічний моніторинг, засоби і заходи боротьби з туберкульозом тварин в умовах радіаційного впливу: Дис...д-ра.вет.наук: 16.00.03 / Кассіч В.Ю. – Харків, 2004.– 408 с.
4. Линникова М.А. Очищенный протеин дериват туберкулина // Проблемы туберкулеза.–1939.– № 12. – С. 3-12.
5. Говоров А.М. Новые туберкулины / А.М. Говоров, Ф.И. Осташко. – Науч.-тех. бюллетень УНИИЭВ.– 1956.– С.12-15.
6. Кассіч Ю.Я. Високоєфективний вітчизняний туберкулін / Ю.Я.Кассіч, В.Ю. Кассіч., П.М.Тихонов, В.М. Горжеєв. – Аграрна наука – виробництву. – 2005.– № 1. – С.26-27.
7. Кассіч В.Ю. Аллергия и аллергическая диагностика инфекционных болезней / В.Ю. Кассич, Н.П.Овдиенко., Е.В.Волосянко, Т.Г.Нестеренко. – Збірник статей міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні проблеми біотехнології, стандартизації та забезпечення контролю якості вет.препаратів, кормів та кормових добавок», присвячена 10-річчю ДНКІБШМ // Вет.біотехнологія. Бюл. № 13 (2). – Київ. – 2008. – С.123-128.
8. Безгин В.М. Совершенствование промышленной технологии (ППД) туберкулина и его биохимическая характеристика.: автореф. Дис.канд. вет. наук : 03.00.04 / В.М. Безгин.– М., 1990. – 27 с.
9. Патент Российской Федерации. RU (11)2035924.–(51)6 А 61 К 39/04. Способ получения туберкулина. Шевырев Н.С., Безгин В.М., Ничеева Л.Д., Солодов Е.Н., Козлов В.Е., Гринев А.А., Сорокина А.А., Алехин В.А., Шаров А.Н., Тырина В.С., Букова Н.К.– (21)93003234/13.– (46)27.05.95.– Бюл. № 15.
10. Патент України на корисну модель №63246 /Синтетичне живильне середовище (Сотона КФ) для прискореного накопичення бактеріальної маси мікобактерій/Кассіч В.Ю., Кассіч О.В., Фотіна Т.І., Фотіна Г.А., Дзюба В.М., Полоз І.М.; Суми, СНАУ. – №u2011014606;заявл.0612.10; опубл.10.10.11, Бюл.№19.
11. Лысенко А.П. Антигены *Mycobacterium Bovis* и атипичных микобактерий,изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота: дис...доктора.вет.наук:16.00.03/Лысенко А.П. – Минск, 1994. – 379 с.
12. Колос Ю.О. Контроль худоби на наявність туберкульозу в країнах-членах ЄС / Ю.О.Колос, В.І. Хоменко, В.Ф. Титаренко, О.М. Клименко. – Матеріали Міжнародної наук.-практ. конференції «Епізоотологія і профілактика інфекційних хвороб великої рогатої худоби», 14-17 березня 2006 року, НАУ, Київ, Україна. – Київ. – 2006. – С. 42-43.
13. Кассіч В.Ю. Протеїногенні властивості штамів *M.bovis* Valle ma «AN5» / В.Ю. Кассіч, Г.І. Ребенко, В.Г. Скрипник, В.О. Ушкалов, А.В. Скрипник, А.А. Замазій // Науковий вісник ветеринарної медицини. Вип. 12 (107) // Біла Церква. – 2013. – С. 26-29.
14. 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. – Вип. 1 (34). – Суми. – 2014. – С. 140-143.
15. Кассіч В.Ю. Розробка та впровадження у виробництво алергенів для діагностики туберкульозу ссавців та птиці // Вісник СНАУ. – Вип.9/2 (22). – Суми. – 2008. – С. 30-33.
16. Кассіч В.Ю. Розробка технології промислового виготовлення алергену з атипичних мікобактерій (ААМ) / В.Ю. Кассіч, Ю.Я. Кассіч // Вісник СНАУ. – Вип. 2 (18). – Суми. – 2007. – С. 66-69.

Головко В.А., Кассич О.В., Кассич В.Ю., Колесникова Е.Ю., Кошельник В.Г. Изучение свойств производственного штамма *M.bovis* Valle КМІЕВ-9КМ

В соответствии со стандартом ЕС PPD-туберкулин для млекопитающих должен изготавливаться из штаммов *M.bovis* «Valle», в то время как при производстве «Туберкулина очищенного (ППД) для млекопитающих в стандартном растворе» ТУУ 24.00497087.645-2001, основным производственным штаммом является «*M.bovis* ІЕКВМ-1». Поэтому разработка сухих очищенных PPD-туберкулинов из штамма *M.bovis* «Valle» является для Украины актуальным. Изученные нами штаммы микобактерий бычьего вида *M.bovis* Valle КМІЕВ-9 та КМІЕВ-9КМ обладают характерными морфологическими, биологическими, культуральными и биохимическими свойствами и являются высокопротеиногенными, что говорит о их перспективности при производстве ППД-туберкулина для млекопитающих.

Ключевые слова: туберкулез, туберкулин, микобактерии *M.bovis* Valle.

Holovko V.A., Kassich O.V., Kassich V.U., Kolesnikova K.U., Koshelnik V.H. Experiment of production strain *M. bovis* Valle-KMIEV-9KM

In accordance with the EU-PPD tuberculin for mammals must be made of strains *M.bovis* «Valle», while the production of protein purified derivativ Tuberculin (PPD) for mammals in the standard solution; TYU 24.00497087.645-2001, production strain is «*M.bovis* ІЕКВМ-1. Therefore razrobotkaka dry cleaned PPD-tuberkulioiv of strains *M.bovis* «Valle» for Ukraine is urgent.

Keywords: tuberculosis, tuberculin, mycobacterium *M.bovis* «Valle».

Дата надходження до редакції: 25.01.2015 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Березовський А.В.

УДК 619.616.98.636.4

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ ЧУТЛИВОСТІ МІКРОФЛОРИ, ЩО БУЛА ІЗОЛЬОВАНА В СВИНАРСЬКИХ ГОСПОДАРСТВАХ СУМСЬКОЇ ОБЛАСТІ, ДО АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ

Н.О. Максименко, аспірантка

Л.Е. Линок, аспірантка

О.В. Фотін, к.вет.н., доцент

Сумський національний аграрний університет

В статті наведені дані по проведенню аналізу чутливості мікрофлори, що була ізольована в свинарських господарствах Сумської області, до антибактеріальних препаратів. Встановлено, що у відношенні до збудників респіраторних хвороб свиней найбільшу активність показали: енрофлоксацин, бровасептол концентрат, Бі-септим, Тім Тіл 250, цефтиоклін, енрофлоксацин, тиоцефур. До таких широко застосовуваних антибіотиків, як гентаміцин, амоксициклін, тілан порівняно швидко розвивалася стійкість збудників і, в умовах господарств спостерігали зниження ефективності цих препаратів.

Ключові слова: свинарство, інфекційні хвороби, антибактеріальні препарати, штами мікроорганізмів.

Постановка проблеми у загальному вигляді. Не важко помітити, що останнім часом лексикон лікаря ветеринарної медицини поповнюється все новими і новими назвами хвороб, в основі патогенезу яких є патології респіраторного тракту. Серед таких хвороб: актинобацильозна плевропневмонія, репродуктивно – респіраторний синдром свиней, ензоотична (мікоплазмозна) пневмонія, легеневий пастерельоз. Також у сучасному свинарстві значну питому вагу займають інфекційні захворювання молодняку з комбінованим ураженням систем органів травлення і дихання. Однією з гострих проблем є респіраторні хвороби вірусно-бактеріальної етіології, широко поширені в багатьох країнах з розвиненим свинарством, наносять відчутний економічний збиток і гальмують розвиток галузі. Інфекційні хвороби: цирковірусна інфекція, гемофільозний полісерозит, актинобацильозна плевропневмонія, найчастіше протікають як змішана інфекція з коливаю-

чимся поєднанням патогенів [1, 2].

Зв'язок з важливими науковими і практичними завданнями. Висвітлені у статті матеріали є частиною наукових досліджень кафедри ветсанекспертизи, мікробіології, зоогієни та безпеки і якості продуктів тваринництва Сумського національного аграрного університету.

Аналіз основних досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми. У спеціалізованих свинарських господарствах України реєструється респіраторний симптомокомплекс, зумовлений складною асоціацією збудників. Наприклад, вірус репродуктивно-респіраторного синдрому свиней, крім репродуктивної системи, вражає органи дихання, персистує в організмі свиней, розмножується в клітинах імунної системи (лімфоцитах і макрофагах), руйнує їх, призводить до іммунодефіцитного стану. У таких тварин створюються умови для залучення в інфекційний процес бактеріальних респіратор-