

УДК 636.09:57.083.33:616.98:579.852.1

О.В. МАЧУСЬКИЙ, канд. вет. наук, зав. сектору
В.О. УШКАЛОВ, докт. вет. наук, професор, чл.-кор. НААН, заст. директора
А.М. ГОЛОВКО, докт. вет. наук, професор, академік НААН, директор
М.В. БАБКІН, канд. вет. наук, ст. наук. співробітник, заст. директора
 Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, Київ

В.Г. КОШЕЛЬНИК, директор
К.Ю. КОЛЕСНІКОВА, канд. вет. наук, нач. цеху
Т.О. ТЕРПЕЦЬКА, лікар вет. медицини, зав. відділу
 Херсонське державне підприємство – біологічна фабрика

РЕЗУЛЬТАТИ РОЗРОБЛЕННЯ ТА ВПРОВАДЖЕННЯ У ПРАКТИКУ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ РЕФЕРЕНТ-СТАНДАРТУ «АНТИГЕН СИБІРКОВИЙ»

У статті окреслено значення реакції преципітації за Асколі в системі діагностики сибірки. Наведено результати розроблення референт-стандарту «Антиген сибірковий», які лягли в основу впровадження його у практику ветеринарної медицини шляхом державної реєстрації. Штами, використовували для його виготовлення, а також розроблена схема виробництва дозволяють отримувати прозорий, безбарвний, активний і специфічний антиген. Застосування цього засобу дозволить у найкоротші строки отримати достовірні результати досліджень матеріалу в реакції преципітації.

Методологічне й інструментальне забезпечення діагностичної роботи лабораторій ветеринарної медицини є запорукою їх ефективної роботи.

Донедавна у щоденній роботі діагностичних лабораторій ветеринарної медицини при дослідженні матеріалу на наявність збудника сибірки керувалися методичними вказівками «Лабораторная диагностика сибирской язвы у животных и людей, обнаружение возбудителя в сырье животного

происхождения и объектах внешней среды», затвердженими 1 вересня 1986 р. Головним управлінням ветеринарії Держагропрому СРСР і Головним управлінням карантинних інфекцій Мінздраву СРСР [3].

Натомість 25 грудня 2014 р. Науково-методична рада Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України затвердила науково-методичні рекомендації «Лабораторна діагностика сибірки тварин, індикація збудника з патологічного та біологічного матеріалу, сирови-

ни тваринного походження та об'єктів навколишнього середовища» [4].

Обидва документи передбачають використання реакції преципітації за Асколі для дослідження на наявність збудника сибірки шкірсировини, шерсті, несвіжого патологічного матеріалу, а також (при постановці гарячим методом) експрес-діагностики патматеріалу.

Цю реакцію запропонували в 1910 р. італійські вчені Асколі (Ascoli) й Валенті (Valenti). Вони виявили, що екстракт із культур *Bacillus anthracis*, так само як і екстракт із органів і тканин трупів тварин, які загинули від антраксу, сполучаючись з активною протисибірковою преципітуючою сироваткою, дає реакцію флокуляції – преципітації [6].

Протягом ста років ця реакція застосовується як надійний інструмент діагностики, з її допомогою вдається виявляти сибірковий антиген у свіжому й несвіжому патологічному матеріалі, а також у шкірі, шерсті тощо.

Заслугою Асколі та Валенті є не лише відкриття реакції, а й те, що вони правильно оцінили практичний бік свого відкриття, зокрема встановили, що екстракти досліджуваного матеріалу резистентні до кип'ятіння [6], а також отримали преципітуючу сибіркову сироватку шляхом інтравенозної гіперімунізації віслюків культурою мікробів антраксу [7].

Через наявність термостабільного преципітиногена ця реакція також має назву термопреципітації. Вона є специфічною й дозволяє виявляти сибірковий антиген навіть у тих випадках, коли бактеріологічне дослідження негативне [2].

Багаторічна практика застосун-





ня реакції себе цілком виправдала. Від часу включення її до системи діагностичних досліджень методика її постановки дещо змінювалася.

Так, ще в 1934 р. Р.І. Расовська та М.І. Міхеєв дійшли висновку, що наявність великої кількості солі в екстракті досліджуваної проби шкіри пригнічує або навіть дає хибно негативний результат реакції преципітації. Було розроблено метод діалізу, за допомогою якого з екстракту видаляли сіль.

Л.Є. Наймушина (1953) при дослідженні вологосоленої сировини запропонувала застосовувати сибіркову преципітуючу сироватку із підвищеною питомою вагою без урахування концентрації солі в екстрактах.

В.І. Кольцов (1970) розробив методику спеціального промивання шкір і виготовлення екстракту на дистильованій воді без додавання солі, але з додаванням 0,3 % кристалічної карболової кислоти [2].

Та спільним для всіх модифікацій реакції преципітації є обов'язкова наявність позитивного контролю під час проведення досліджень. Як позитивний контроль рекомендовано застосовувати антиген сибірковий [3, 4].

Антиген готують із вірулентної культури *Bacillus anthracis* [1]. При цьому він має являти собою прозору безбарвну рідину, яка утворює кільце преципітації із сироваткою сибірковою преципітуючою протягом хвилини.

За даними Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України у 2009 р. було зареєстровано «Антиген сибірковий стандартний» (реєстраційне свідоцтво ВВ-00096-06-09, термін дії – 2009–2014 рр.). Відповідно до короткої характеристики препарату це була прозора рідина від світло-жовтого до темно-жовтого кольору, отримана із безкапсульного штаму сибірки. Слід зазначити, що кольоровість даного антигену ускладнює облік результатів досліджень. У той же час аналіз класичних схем [1, 6, 7] виготовлення антигену сибіркового для реакції преципітації свідчить, що з цією метою необхідно використовувати капсульний штам, а кінцевий продукт має бути безбарвний.

Мета досліджень – розробити технологію виготовлення прозорого й активного антигену сибіркового для реакції преципітації із комбінуванням капсульного та безкапсульних штамів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Робота виконувалася на базі Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ). Масштабування виробництва й відпрацювання технології виготовлення у виробничих умовах проводились на базі Херсонського державного підприємства – біологічної фабрики. На базі ДНКІБШМ було виготовлено три серії експериментальних зразків референт-стандарту «Антиген сибірковий», у виробничих умовах – дослідні зразки стандарту, а також дві установчі серії за участі авторів [9].

Як виробничі штами використовували матричну культуру капсульного штаму *Bacillus anthracis matrix II вакци-на Ценковського* (1984 р. виготовлення), отриману з Херсонської біофабрики. Попередньо цей штам було перевірено на відповідність біологічним властивостям і депоновано в Національному центрі штамів мікроорганізмів (депозитарний номер 600). Також при розробленні референт-стандарту використовували два безкапсульні штами: *Bacillus anthracis Sterne 34F2* (депози-

тарний номер 504) та *Bacillus anthracis 3/97* (депозитарний номер 595). Слід зазначити, що штам *Bacillus anthracis Sterne 34F2* є вакцинним і застосовується для виготовлення вакцини проти сибірки тварин [8], якою вже не перший рік успішно імунізують сільськогосподарських тварин на території України. А безкапсульний штам *Bacillus anthracis 3/97* у 1997 р. було виділено науковцями (М.В. Бабкін зі співавт.) із заглоткових лімфатичних вузлів свині в одному з господарств Харківської області.

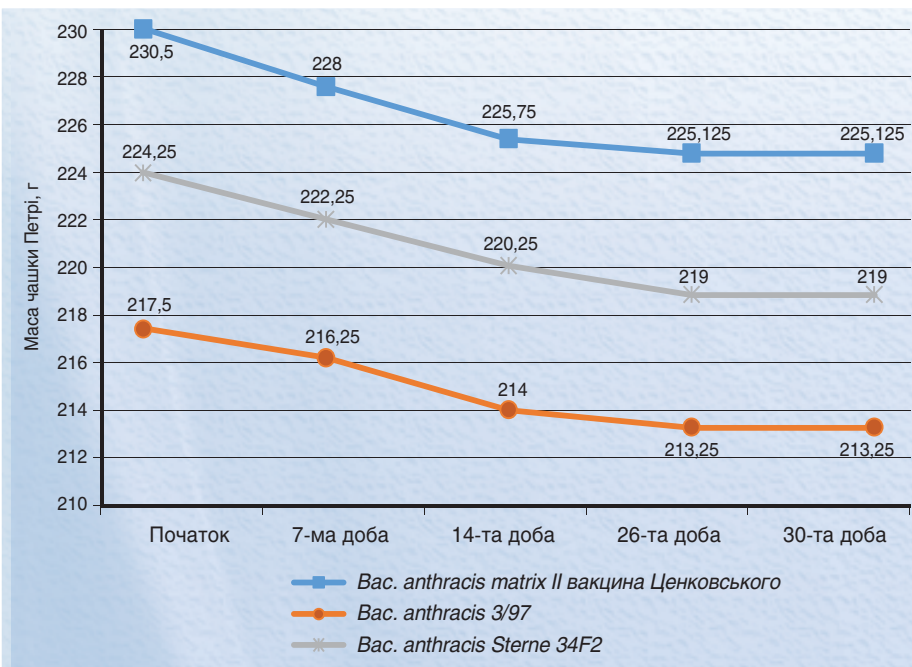
Безпосередньо перед початком роботи всі вищезгадані штами було перевірено на відповідність паспортним характеристикам за такими показниками: морфологічні, тинкторіальні, культуральні, біохімічні, гемолітичні й біологічні властивості. Дослідження проводили за загальноприйнятими методиками [2, 5–7]. У роботі використовували загальноновживані живильні середовища, які містили 120±20 мг % амінного азоту і мали рН 7,2±0,2. Біомасу культур *Bacillus anthracis* зважували на лабораторних вагах AXIS ADG300C третього класу точності.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для реалізації поставленої мети нам було проаналізовано літературні дані щодо технології виготовлення антигену



УВАГА! ТРИВАЄ ПЕРЕДПЛАТА НА ЖУРНАЛ НА ДРУГЕ ПІВРІЧЧЯ 2015 РОКУ!



Динаміка зневоднення целюлярної маси штамів збудника сибірки, підданої автоклавуванню

сибіркового й проведено патентний пошук. При цьому було встановлено, що стандартизований антиген із необхідними фізичними показниками, високою активністю й специфічністю можна отримати шляхом накопичення целюлярної маси виробничого штаму на щільному живильному середовищі.

Розроблення й упровадження референт-стандарту «Антиген сибірковий» проводилось у декілька етапів: виготовлення в лабораторних умовах і вивчення ефективності антигену та масштабування промислового виробництва.

Для порівняння (з метою виробництва експериментальної серії) ми взяли один капсульний і два безкапсульні штам збудника сибірки та виготовили матричні культури даних штамів: *Bacillus anthracis matrix II* вакцина Ценковського, *Bacillus anthracis Sterne 34F2* і *Bacillus anthracis 3/97*. Для цього використовували бульйон Хоттінгера (120 ± 20 мг% аміноного азоту, рН $7,2 \pm 0,2$). Інкубацію проводили в термостаті за температури 37 ± 1 °С упродовж 20–24 год. Даними матричними культурами було засіяно ємності зі щільним живильним середовищем – агаром Хоттінгера (120 ± 20 мг% аміноного азоту, рН $7,2 \pm 0,2$) та інкубовано в термостаті за температури 37 ± 1 °С упродовж 18–20 год.

Після інкубації зі щільного живильного середовища за допомогою шпатель знімали целюлярну масу збудників сибірки й поміщали в чашку Петрі. Наступним етапом, згідно з даними літератури, мало бути знешкодження отриманої бактеріальної маси шляхом автоклавування за температури 120 °С протягом 30 хв. Але, враховуючи здатність *Bacillus anthracis* до споруляції та можливого їх виживання в такому режимі автоклавування, з метою забезпечення біобезпеки перед знешкодженням целюлярну масу перевіряли на наявність феномену споруляції. При цьому виготовляли мазок і фарбували його 0,5% водним розчином малахітового зеленого впродовж 5 хв над киплячою водою. Після цього протягом 30 с мазок дофарбовували сафраніном. За наявності феномену споруляції спори мали бути яскраво-зелені, а вегетативні форми – червоно-коричневі. У нашому випадку в мазках з усіх трьох штамів спостерігали лише темно-червоні палички, а спор не виявляли. Як позитивний контроль використовували спорову суспензію «Вакцини проти сибірки тварин із штаму Sterne 34F2». Одержані результати мікроскопічних досліджень стали підставою для автоклавування.

Отриману бактеріальну масу, поміщену в чашки Петрі, піддавали автоклавуванню. Після цього чашки зважували й поміщали в термостат до повного висихання й набуття сталої маси. Динаміку зневоднення відображено на рисунку.

Згідно з отриманими даними можна стверджувати, що висихання біомаси бактерій до сталої маси настає через 21 добу. При цьому слід зазначити, що при поміщенні целюлярної маси в чашку Петрі грудочками період її висихання буде триваліший, ніж у чашках, де зняту масу рівномірно розподіляють по поверхні.

Після набуття сталої маси отриману біомасу ретельно перетирали у фарфорових ступках і зважували з точністю до третього числа. Змішували за формулою «60:20:20» – 60 % сухої целюлярної маси штаму *Bacillus anthracis matrix II* вакцина Ценковського змішували із 20 % штаму *Bacillus anthracis Sterne 34F2* та 20 % штаму *Bacillus anthracis 3/97*.

Наступним етапом була екстракція отриманої маси штамів у стерильному фізіологічному розчині у співвідношенні 1:5000 за температури 4 °С упродовж 24 год.

Після завершення екстракції розчини фільтрували й перевіряли на активність і специфічність. Після отримання задовільних результатів проміжного контролю екстракт фасували до ампул, ампули запаювали й стерилізували за температури 120 °С протягом 30 хв.

Готовий продукт перевіряли за такими показниками: зовнішній вигляд; наявність сторонніх домішок, тріщин в ампулах, етикетування; контамінація сторонньою бактеріальною і грибною мікрофлорою; активність, специфічність і відтворюваність. При цьому облік результатів не був складним, оскільки антиген був безбарвним і прозорим.

Отримані результати стали підґрунтям для формування досьє та проведення міжвідомчих комісійних випробувань референт-стандарту за участі представників діагностичної служби ветеринарної медицини з метою його державної реєстрації на території України.



У результаті проведеної роботи було доведено активність і специфічність розробленого стандарту, а також відтворюваність результатів досліджень із його використанням. Даний референт-стандарт було успішно зареєстровано в Україні (реєстраційне свідоцтво ВВ-00721-06-14 від 26 листопада 2014 р.) й розпочато його промислове виробництво на Херсонському державному підприємстві – біологічній фабриці. При цьому перші виробничі серії референт-стандарту було виготовлено за безпосередньої участі авторів. Також успішно проведено контроль готового препарату.

ВИСНОВКИ

Враховуючи постійну небезпеку виникнення спалахів сибірки на території України, а також велику кількість худобомогильників із захороненнями тварин, які загинули від цього захворювання, у спеціалістів діагностичної служби має бути надійний і малозатратний спосіб для швидкого й ефективного виявлення збудника сибірки. Одним із таких інструментів є реакція преципітації за Асколі. В результаті проведених досліджень було встановлено таке.

1. Аналіз наявних технологій виготовлення антигену сибіркового дозволить виявити критичні точки, які можуть впливати на якість препарату і, надалі, на результат досліджень.

2. Для отримання достовірних результатів реакції преципітації необхідна наявність позитивного контролю (антигену сибіркового), який має бути прозорим, безбарвним, активним і специфічним.

3. Штами *Bacillus anthracis matrix II* вакцина Ценковського, *Bacillus anthracis Sterne 34F2* та *Bacillus anthracis 3/97* мають типові серологічні властивості із сироваткою сибірковою преципітуючою і можуть використовуватися для виготовлення антигену сибіркового.

4. Розроблена технологія виробництва референт-стандарту відрізняється від аналогів тим, що використовують три авірулентні штами збудника сибірки, додатково перевіряють отриману

целюлярну масу на предмет споруючії, а готовий антиген – за зовнішнім виглядом, активністю, специфічністю та відтворюваністю. Така технологічна схема дозволяє отримати прозорий, безбарвний, активний і специфічний сибірковий антиген для досліджень у реакції преципітації.

Подальші наші дослідження будуть спрямовані на розроблення комплексних засобів для діагностики сибірки в реакції преципітації.

СПИСОК

ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Биологические** и химиотерапевтические ветеринарные препараты / Соавт.: С.Г. Колесов [и др.]. – 3-е изд., перераб. и доп. – М., 1963. – 519 с.
2. **Коротич А.С.** Сибирская язва / А.С. Коротич, Л.И. Погребняк. – К.: Урожай, 1976. – 160 с.
3. **Лабораторная** диагностика сибирской язвы у животных и людей, обнаружение возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды: методические указания. – М.: ВО Агрпроимиздат, 1989. – 30 с.
4. **Лабораторна** діагностика сибірки тварин, індикація збудника з патологічного та біологічного матеріалу, сировини тваринного походження та об'єктів навколишнього середовища: наук.-метод. рекомендації / В.Г. Скрипник, І.О. Рубленко, Т.О. Гаркавенко [та ін.]. – К., 2014. – 76 с.
5. **Мачуський О.В.** Вдосконалення системи контролю якості спорових вакцин проти сибірки: дис. ... канд. вет. наук: спец. 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія» / О.В. Мачуський. – К., 2012. – 221 с.
6. **Рево М.В.** Курс спеціальної мікробіології. Підручник для студентів медичних та ветеринарних шкіл / М.В. Рево. – М.; Харків, 1931. – С. 493–508.
7. **Сибирская** язва / Под ред. С.Г. Колесова. – М.: Колос, 1976. – 228 с.
8. **Спосіб** виготовлення засобу профілактики сибірки тварин зі штаму *Bacillus anthracis Sterne 34F2* / А.М. Головка, В.О. Ушкалов, А.В. Мачуський та співавт. – Патент на корисну модель МПК (2011.01) № 60603, Заявл. 23.11.2010; Опубл. 25.06.2011; Бюл. № 12.
9. **Тимошенко В.С.** Система розроблення та поставлення продукції на виробництво. Основні терміни та визначення: ДСТУ

- 3278-95 / В.С. Тимошенко, Г.Г. Бакунова. – Введено вперше; чинний від 1997-01-01. – К.: Держстандарт України, 1998. – III, 58 с.
10. **Ушкалов В.А.** Биологические свойства вакцины против сибирской язвы из штамма *Bacillus Anthracis Sterne 34F2* / В.А. Ушкалов, А.В. Мачуський, Л.Н. Виговская // Сб. науч. трудов Всерос. научно-исслед. и технол. ин-та биол. пром-ти «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК». Матер. междунар. научно-практ. конференции 5–7 декабря 2012 г., Щелково, 2012. – С. 331–338.

Одержано 3.06.2015

Результаты разработки и внедрения в практику ветеринарной медицины референт-стандарт «Антиген сибиреязвенный». А.В. Мачуський, В.А. Ушкалов, А.Н. Головка, М.В. Бабкин, В.Г. Кошельник, Е.Ю. Колесникова, Т.А. Терпецкая

В статье обозначено значение реакции преципитации по Асколи в системе диагностики сибирской язвы. Отражены результаты разработки референт-стандарт «Антиген сибиреязвенный», которые легли в основу внедрения его в практику ветеринарной медицины путем государственной регистрации. Штаммы, используемые для изготовления референт-стандарт, а также разработанная схема производства позволяют получать прозрачный, бесцветный, активный и специфический антиген. Применение данного средства позволит в кратчайшие сроки получать достоверные результаты исследований материала в реакции преципитации.

Results of the development and introduction to veterinary practice of reference-standard «Anthrax antigen». O.V. Machuskyy, V.O. Ushkalov, A.M. Golovko, M.V. Babkin, V.G. Koshelnyk, K.Y. Kolesnikova, T.O. Terpetska

The paper outlines the importance for the Ascoli precipitation reaction in the system diagnostics anthrax. The results of development reference-standard «Anthrax antigen» which formed the basis for its introduction in the practice of veterinary medicine through state registration. The strains used for manufacturing of reference-standard, and developed a scheme of production, allows to get clear, colorless, active and specific antigen. Use of this product will in no time get reliable results of research material in the reaction of precipitation. ☉