

PPD TUBERCULIN MAMMALIAN PURIFIED FOR ALERGICAL DIAGNOSTIC OF ANIMAL TUBERCULOSIS

V. A. Holovco¹, O. V. Kassich¹, V. U. Kassich²

¹Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine
E-mail: epizootology@hdzva.edu.ua, asot.alex@yandex.ua

²Sumy national agrar university, Sumy, Ukraine
E-mail: kassich_v_u@ukr.net

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

Selected by breeding, the sealed production strains *M. bovis* Valle KMIEV-9 and *M. bovis* Vallee KMIEV-9KM appeared to be highly proteinogenic, they comply with the requirements of Council Directive 97/12 (dated March 17, 1997) and used during the production of experimental production series PPD-tuberculin for purified mammalian. The mass fraction of protein in a sample of tuberculin made from the strain *M. bovis* Valle KMIEV-9 is $(0,89 \pm 0,1) \text{ mg / cm}^3$, while in the sample of tuberculin of the strain *M. bovis* Vallee, KMIEV-9KM it is significantly higher ($p < 0,05$) and it comes up to $(1,20 \pm 0,2) \text{ mg / cm}^3$. The production strain of mycobacterium *M. bovis* Vallee KMIEV-9KM during cultivation on a synthetic nutrient medium of Soton HB or KF allows to accelerate the growth and increase the accumulation of bacterial mass of mycobacteria from one vial to $(16,1 \pm 0,2) \text{ mg}$ and allows to increase the output of tuberculin accordingly to $(1,20 \pm 0,1) \text{ mg / cm}^3$. For the adaptation, selection and accumulation of production strains bacterial mass, Soton KF and Soton-KhB nutrient media were developed, on which the *M. bovis* culture begins to grow $(4,2 \pm 1,1)$ days earlier and gives more accumulation of bacterial mass (microbial film is formed $(4,1 \pm 0,9)$ days earlier, in comparison with an initial strain).

New technological methods of PPD-tuberculin manufacturing have been developed: the method of obtaining tuberculin from culture fluid and bacterial mass of mycobacteria, and the method of manufacturing PPD-tuberculin using membrane microfiltration and ultracentrifugation methods, which allowed to obtain highly active and specific diagnostic allergen.

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

ППД-ТУБЕРКУЛІН ДЛЯ ССАВЦІВ ОЧИЩЕНИЙ ДЛЯ АЛЕРІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ТВАРИН

В. О. Головко¹, О. В. Кассіч¹, В. Ю. Кассіч²

¹Харківська державна зооветеринарна академія, Харків, Україна
E-mail: epizootology@hdzva.edu.ua, asot.alex@yandex.ua,

²Сумський національний аграрний університет, Суми, Україна
E-mail: kassich_v_u@ukr.net

В роботі викладено теоретичне та експериментальне обґрунтування, узагальнені результати дослідження щодо розробки, та впровадження препарату «ППД-туберкулін для ссавців очищений». Відібрані шляхом селекції та задекларовані в депозитарії ДНКІБШМ виробничі штами *M. bovis* Vallee KMIEB-9 та *M. bovis* Vallee KMIEB-9KM виявились високопротеїногенними, відповідають вимогам Директиви Ради ЄС 97/12 (від 17 березня 1997 р.) і використані під час виготовлення дослідно-виробничих серій ППД-туберкуліну для ссавців очищеного. Для адаптації, селекції та накопичення бактерійної маси виробничих штамів розроблені поживні середовища Сотона КФ та Сотона ХБ, на яких культура *M. bovis* починає рости раніше на $(4,2 \pm 1,1)$ діб і дає більше накопичення бактерійної маси (мікробна плівка формується на $(4,1 \pm 0,9)$ діб раніше, в порівнянні з вихідним штамом). Розроблено нові технологічні прийоми виготовлення ППД-туберкуліну з використанням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифування при 14 тис. об./хв., що дозволило отримати високоактивний та специфічний діагностичний алерген. Під час виготовлення туберкуліну з використанням розробленої технології в препараті достовірно збільшуються ($p < 0,05$) вихід протеїну після осадження ТХО на $(8,6 \pm 0,5) \text{ г}$, вихід туберкуліну з 1 л середовища на $(0,7 \pm 0,1) \text{ г}$ та масова частка білку на $(0,6 \pm 0,1) \text{ мг/см}^3$. Препарат виходить гарантовано стерильним та високо очищеним.

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

Вступ

Серед зоонозних захворювань туберкульоз за своїм соціальним, економічним епізоотологічним та епідеміологічним значенням займає особливе місце [1, 2, 3]. Туберкульоз тварин спричиняє значні економічні збитки сільському господарству та становить суттєву загрозу здоров'ю людей. Міжнародний

ветеринарний кодекс МЄБ визначає туберкульоз як захворювання, що вимагає обов'язкового декларування [4, 5, 6]. Боротьба з цією зооантропонозною хворобою має не тільки економічне, але й соціально-гігієнічне та епідеміологічне значення (Кассіч Ю. Я., 1990, 2002; Смолянинов Ю. И., 2005; Бусол В.О., 2006, 2008; Овдиенко Н. П., 2008; Гулюкин М. И., 2009;

Нуратинов Р. А., 1998, 2009; Мандигра М. С., 2013; Завгородній А. І. з співав., 2015; Головка В. А. з співав., 20015; Ткаченко О. А., 2016; Найманов А. Х., 2017, та інші).

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 та вдосконалений фахівцями лабораторії туберкульозу ННЦ ІЕКВМ НААН України (Ю. Я. Кассіч, А. І. Загородній, П. М. Тихонов, В. Ю. Кассіч, В. В. Доценко, 2001, 2003; Дегтярьов І. М. з співав., 2006, 2009; Білушко В. В. з співав., 2011, 2015, 206), який виготовляють з використанням виробничого штаму *M. bovis* ІЕКВМ-1 [4, 7, 8]. 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. Крім того, використання глибинних фільтрів призводить до значних втрат білку, що знижує вихід препарату [4, 6, 10]. 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 туберкулопротеїну (Шевырев Н. С. з співав., 1999, 2006; Безгин В. М. з співав., 1999, 2006, 2012; Безгина Н. В. з співав., 2006, 2007; Козлов В. Е. з співав., 2004, 2007, та ін.).

Завдання дослідження. Перелічені факти переконливо свідчать, що тваринництво України за поголов'я великої рогатої худоби близько 4 млн. голів потребує щорічного виготовлення та використання значної кількості високоактивного та специфічного ППД-туберкуліну для ссавців, який відповідає вимогам Європейського співтовариства і забезпечує якісне та ефективне алергічне дослідження худоби на туберкульоз (за 2016 рік проведено 3,4 млн. алергічних досліджень на туберкульоз). Тому, актуальним та перспективним для тваринництва і ветеринарної медицини України є пошук та впровадження у виробництво високопротеїногенних виробничих штамів *Mycobacterium bovis*, розробка ефективних і високопродуктивних живильних середовищ для їх культивування, впровадження в технологічний процес виготовлення ППД-туберкуліну мембранних технологій, використання методів мікрофільтрації та ультрацентрифугування, розробка нових та оптимізація і гармонізація існуючих вітчизняних алергенів у відповідності з вимогами ЄС [11, 12, 13].

Матеріали і методи дослідження

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

мікрофільтрації та ультрацентрифугування [4, 14, 18].

Результати та їх обговорення

Першим етапом роботи був підбір виробничих штамів. Для цього провели адаптацію, дослідження морфологічних, культуральних та біологічних властивостей та депонування виробничого штаму *M. bovis* Vallee, оскільки саме цей штам разом із штамом AN-5 рекомендує Директива Ради ЄС 97/12 від 17 березня 1997 р. в якості виробних при виготовленні ППД-туберкуліну для ссавців.

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 «*M. bovis* Vallee KMIEB-9» розконсервували та адаптували до поживних середовищ Павловського, Левенштейна-Ієнсена, ІЕКВМ, Сотона КФ та Сотона ХБ [1, 2, 13].

Під час культивуванні штаму збудника туберкульозу бичачого виду *M. bovis* Vallee KMIEB-9 на «Живильному середовищі Сотона КФ для прискореного накопичення бактеріальної маси» [14] було відзначене прискорення росту мікобактерій і підвищення накопичення бактеріальної маси у порівнянні з середовищем Сотона за класичним прописом. Появу первинного росту культури виробничого штаму *M. bovis* Vallee KMIEB-9 спостерігали на (3,0±0,1) доби раніше; формування суцільного росту (мікробної плівки) – на (6,0±0,3) діб раніше. Вихід бактеріальної маси був на (7,4±0,3) мг більшим. Тобто середовище Сотона КФ мало стимулюючі ріст мікобактерій, а також селективні властивості, що призвело до отримання штаму з прискореним ростом мікобактерій. Відібраному шляхом селекції ізоляту мікобактерій з прискореним ростом після ретельного вивчення його культуральних, морфологічних та біологічних властивостей присвоїли назву: «виробничий штам збудника туберкульозу бичачого виду *M. bovis* Vallee KMIEB-9KM» [1, 2, 5, 13]. Після пересіву на виробниче середовище Сотона ХБ [15] феномен прискорення росту зберігається впродовж 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). Одержаний штам являє собою фенотиповий модифікант штаму збудника туберкульозу бичачого виду *M. bovis* Vallee KMIEB-9 [1, 2, 15].

При дослідженні електронномікроскопічних препаратів з культур виробничого штаму *M. bovis* Vallee KMIEB-9KM відзначали, що мікобактерії мають вигляд коротких або помірно довгих паличок, розташованих у вигляді скупчень, конгломератів. Відзначається поліморфізм мікроорганізмів [12, 13].

Чисті культури першої та подальших генерацій штаму *M. bovis* Vallee KMIEB-9KM на середовищі Сотона КФ та Сотона ХБ в мазках, пофарбованих за Ціль-Нільсеном мають вигляд червоного кольору паличок. На МПА та МПБ не ростуть; ростуть на яєчних та картопляних живильних середовищах тільки за 37 °С. Колонії культур сухі, дрібні, кольору слонової кістки.

Швидкість росту в субкультурі 10-20 діб. На поверхні рідких живильних середовищ утворюють крихкувату плівку, без помутніння середовища [1, 2, 14].

Під час бактеріологічних досліджень проводили культивування та накопичення бактеріальної маси мікобактерій штаму *M. bovis Valle* KMIEB-9 та штаму *M. bovis Vallee* KMIEB-9KM на середовищі Сотона ХБ. Досліди проводили в трьох повторностях. Визначали терміни початку первинного, суцільного росту та вагу

накопиченої бактеріальної маси виробничих штамів. Результати дослідів наведені в таблиці 1.

Матеріали таблиці 1 свідчать, що культура *M. bovis Vallee* KMIEB-9KM починала рости раніше на (2,0±0,1) доби, давала більше на (6,0±0,1) мг накопичення бактеріальної маси. Мікробна плівка формувалась на (4,5±0,2) доби раніше, в порівнянні з вихідним штамом *M. bovis Vallee* KMIEB-9.

Таблиця 1

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

Дослід 1	Дослід 2
Штам <i>M. bovis Vallee</i> KMIEB-9	Штам <i>M. bovis Vallee</i> KMIEB-9KM
Термін початку первинного росту (через-діб)	
10,0±1,0	8,0±1,0
Термін формування мікробної плівки (через-діб)	
19,5±3,0	15,0±0,9
Вага накопиченої бактеріальної маси (мг)	
59,5±0,3	65,5±0,2

Таким чином, використання виробничого штаму *M. bovis Vallee* KMIEB-9KM дозволяє прискорити ріст і підвищити накопичення бактеріальної маси мікобактерій з одного флакону з (59,5±3,5) до (65,5±0,2) мг – на (6,0) мг і дає можливість прискорити технологічний процес та збільшити вихід туберкуліну.

Результати досліджень використані під час депонування у депозитарії ДНКІБШМ виробничих штамів в Депозитарії ДНКІБШМ. Одержані свідоцтва про первісне депонування виробничого штаму *M. bovis Vallee* KMIEB-9 за № 538 та виробничого штаму *M. bovis Vallee* KMIEB-9KM за № 539. Обидва штами можуть використовуватись для виготовлення ППД-туберкуліну для ссавців.

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 Derivat*iv – 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 удосконалили М. А. Лінніковою (1959), О. М. Говоровим, Ф. І. Осташком (1952, 1956), Ю. Я. Кассічем., В. В. Блушом, А. І. Завгороднім (2004, 2006, 20011, 2014) та іншими дослідниками. Недоліком такого способу є низький вихід та обмежена специфічність кінцевого продукту – ППД-туберкуліну. Крім того, найбільш вразливою ланкою технологічного процесу є глибинна стерилізуюча фільтрація через азбестові фільтри, що не дозволяє одержати гарантовано стерильний

препарат та призводить до втрат на таких фільтрах значної кількості білка.

Для уникнення означених недоліків нами запропонована технологічна схема одержання ППД-туберкуліну, що включає обробку культуральної рідини після відділення бактеріальної маси виробничого штаму *M. bovis Vallee* KMIEB-9KM методом мембранної мікрофільтрації з використанням капсул *Sartoclean*®CA з діаметром пор 0,45 мкм та відділення білкових фракцій туберкуліну після осадження їх трихлороцтовою кислотою шляхом ультрацентрифугування за 14 тис. об./хв. з подальшою стерилізуючою мікрофільтрацією одержаних пермеатів через капсули *Sartoclean*®CA з діаметром пор 0,2 мкм.

Моношарові фільтри *Sartoclean*®CA із ацетату целюлози з гетерогенним подвійним шаром завдяки вбудованій системі попередньої фільтрації, необхідній для економічності компоновки системи, при утримуючій мікробній фільтрації забезпечують найвищі показники загальної пропускної здатності і найвищий вихід протеїну. Після мікрофільтрації на ультрафільтраційних мембранних фільтрах *Sartoclean*®CA з діаметром пор 0,45-0,2 мкм (NBSP) та *НОММ* 150-1000 кДа, препарат містить білкові фракції мікобактерій з молекулярною масою 150-1000 кДа, які мають найвищі показники діагностичної активності та специфічності.

Запропонованим нами способом протеїн з суспензії відокремлювали від рідини шляхом ультрацентрифугування за 14 тис. об./хв. на промислового високообертівому сепараторі малого об'єму. Результати дослідів наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

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

Характеристика досліджу	Вихід туберкулопротеїну після осадження ТХО, г	Вихід туберкулопротеїну з 1 л середовища, г	Масова частка білка, мг/см ³
Класична технологія виготовлення туберкуліну	19,8±0,2	1,4±0,3	0,8±0,1
Технологія з застосуванням мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування	28,4±0,3	2,1±0,4	1,4±0,2

Матеріали таблиці 2 свідчать, що під час використання для виготовлення туберкуліну технології з мембранною мікрофільтрацією та ультрацентрифугуванням в препараті достовірно (на 8,6±0,1) г збільшується вихід туберкулопротеїну після осадження трихлороцтовою кислотою, вихід туберкулопротеїну з 1 л середовища – на (0,7±0,1) г та масова частка білка – на (0,6±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 виходить стерильним, високо очищеним, містять білкові фракції з найвищими показниками діагностичної активності і специфічності (150-1000 кДа), 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 і води.

Висновки

1. Відібрані шляхом селекції, задепоновані та впроваджені у виробництво виробничі штами *M. bovis Vallee* KМІЕВ-9 та *M. bovis Vallee* KМІЕВ-9KM являються 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* KМІЕВ-9 становить (0,89±0,1) мг/см³, а в пробі туберкуліну з штаму *M. bovis Vallee* KМІЕВ-9KM є достовірно більшою ($p<0,05$) і становить (1,20±0,2) мг/см³.

Використання виробничого штаму *M. bovis Vallee* KМІЕВ-9KM під час культивування на синтетичному живильному середовищі Сотона ХБ дозволяє прискорити ріст і накопичення та підвищити вихід бактерійної маси мікобактерій з одного флакону на (6,0-7,9) мг і дає можливість відповідно прискорити технологічний процес та збільшити вихід туберкуліну до (1,20±0,1) мг/см³.

2. Під час виготовлення експериментальних серій ППД-туберкуліну для ссавців очищеного розроблені нові технологічні прийоми з використанням методів мембранної мікрофільтрації та ультрацентрифугування, що дозволило отримати високоактивний та специфічний діагностичний алерген. Використання технологій з мембранною мікрофільтрацією та ультрацентрифугуванням призводить до достовірного збільшення ($p<0,05$) в препараті виходу протеїну після осадження ТХО на (8,6±0,5) г, виходу туберкуліну з 1 л середовища на (0,7±0,1) г та масової частки білка на (0,6±0,1) мг/см³. Препарат виходить стерильним та високоочищеним.

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

References

- 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. – Вип. 33, ч. 2 «Ветеринарні науки». – С. 95–101.
- Вивчення властивостей виробничого штаму *M. bovis Vallee* KМІЕВ – 9 КМ / В. О. Головка, О. В. Кассіч, В. Ю. Кассіч [та ін.] // Вісник Сумського національного аграрного університету. – 2015. – Вип. 1(36). – С. 106–109.
- 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. – Вип. 6(38). – С. 119–124.
- Продукція туберкулопротеїнів виробничим штамом *M. bovis Vallee* KМІЕВ-9 КМ / В. О. Головка, О. В. Кассіч, В. Ю. Кассіч [та ін.] // Вісник Сумського національного аграрного університету. – 2015. – Вип. 7(37). – С. 104–108.
- 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. – Т. 52, вып. 1. – С. 38–42.
- Алергічна діагностика зоонозів та засоби для її проведення / В. Ю. Кассіч, А. Г. Левченко, В. Д. Левченко [та ін.] // Вісник Сумського національного аграрного університету. – 2016. – Вип. 1 (40). – С. 164–169.
- 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.

8. 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.
9. Дослідження впливу опромінення на ультраструктуру та мінливість мікобактерій / В. Ю. Кассіч, А. Г. Левченко, Ю. А. Байдевятов [та ін.] // *Scientific Journal «ScienceRise»*. Ветеринарні науки. – 2017. – № 11 (40). – С. 6–14.
10. Дезінфекція виробничих приміщень неблагополучних щодо туберкульозу господарств з використанням препарату «Бровадез-плюс» / В. Ю. Кассіч, Т. І. Фотіна, А. В. Березовський [та ін.] // Вісник Сумського НАУ. – 2010. – Вип. 8 (27). – С. 44–49.
11. Контроль якості експериментальної серії ППД-туберкуліну для ссавців / В. Ю. Кассіч, А. Г. Левченко, О. В. Кассіч [та ін.] // Вісник Сумського національного аграрного університету. – 2016. – Вип. 11 (39). – С. 100–106.
12. Левченко А. Г. Модифицированная методика подготовки производственного штамма *M. bovis* «Valle» КМИЗВ-9 КМ для исследований растровым электронным микроскопом / А. Г. Левченко, А. В. Кассич // Молодежь и инновации – 2017. В двух частях / Учреждение образования «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия». – 2017. – Ч. 2. – С. 105–107.
13. Патент на корисну модель «Виробничий штам *M. bovis* Valle КМИЗВ-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.
14. Деклараційний патент 63246 U, МПК C12N 1/20, C 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.

UDC 619:616-092:615:636.4

BIOCHEMICAL PARAMETERS OF PIGLET BLOOD AT COLIENTEROTOXEMIA SECONDARY TO CUPRUM, FERRUM AND COBALT EXCESSES IN FEEDS

I. Zapeka¹, I. Yatsenko²

¹Regional State Laboratory of State service for food safety and consumer protection
for Poltava region, Poltava, Ukraine
E-mail: iryna.zapeka@gmail.com

²Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine
E-mail: yacenko-1971@ukr.net

Rationale. Colienterotoxemia is a dangerous pig disease causing significant economic losses to swine breeding. Pre-weaning and weaned piglets and weaning piglets as well are sick and die. During study of colienterotoxemiapathogenesis, it was found that the disease occurs due to factors such as stress (after piglet weaning), the presence of *E.coli* hemolytic strains (reservation variant), the influence of suppressor factors on immunity, and an unbalanced diet of nutrients. In particular, Cuprum, Ferrum and Cobalt excesses can specifically affect animal organs and tissues resulting in the development of various pathological processes in parenchymatous organs, haematological and immune organs complicating the diagnosis of the underlying disease.

All processes occurring in the body are specifically represented in the blood biochemical composition indicating the degree of endogenous intoxication, the metabolic product accumulation stipulating the health state, and, consequently, the animal productivity. Therefore, study of biochemical blood parameters of piglets affected by colienterotoxemia secondary to Cuprum, Ferrum and Cobalt excesses in feeds is rather promising research area.

Results. Significant abnormalities in the biochemical parameters of blood serum are observed in piglets at colienterotoxemia secondary to Cuprum, Ferrum and Cobalt excesses in feeds. These abnormalities are characterized by increase in total protein by 13.37% ($p \leq 0.01$), dysproteinemia (A/G ratio was decreased in 2 times ($p \leq 0.05$), enzyme activity in serum (gamma-glutamyltranspeptidase was increased by 32.6%, lactate dehydrogenase concentration – by 31.65%, alkaline phosphatase – by 77%, aspartate aminotransferase was – in 2.34 times, alanine aminotransferase – in 3.23 times), bilirubinemia (total bilirubin level was increased in 4.6 times, direct bilirubin – in 2.9 times, indirect bilirubin – in 6.4 times), hyperglycemia (glucose was increased by 22.85%) and hypocholesteremia (total lipids were decreased in 2 times, cholesterol – by 30 %).

Specified abnormalities in the biochemical blood parameters of sick piglets occur due to *E.coli* toxin pathogenic action on animal body, and long-term intake of Cuprum, Ferrum and Cobalt to piglet body in amounts exceeding the