



Тваринництво, ветеринарна медицина

УДК 619:616.98:579.
873.18
© 2012

І.М. Дегтярьов,
кандидат
ветеринарних наук
ННЦ «Інститут
експериментальної
і клінічної ветеринарної
медицини»

УДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ВИГОТОВЛЕННЯ ОЧИЩЕНОГО ТУБЕРКУЛІНУ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ТВАРИН

Наведено результати порівняльного вивчення активності експериментальних мікросерій туберкулінів, виготовлених за вдосконаленою технологією в дослідках на великій рогатій худобі.

Туберкульоз має особливе значення серед інфекційних захворювань, оскільки завдає великих економічних збитків тваринництву і становить постійну небезпеку для здоров'я людини [4].

Під час проведення протитуберкульозних заходів важливою є організація ефективної діагностичної системи, що ґрунтується на використанні високоспецифічних діагностиків [1]. Ефективність виявлення хворих на туберкульоз тварин визначається насамперед високою видовою специфічністю та біологічною активністю туберкулінів. У багатьох країнах для захиттєвої діагностики туберкульозу тварин застосовують очищені ППД-туберкуліни. Діагностичною речовиною таких туберкулінових препаратів є білкові сполуки мікобактерій туберкульозу. Найактивнішими та специфічними є ті протеїни, які за багаторазового введення не формують у тварин реакції імунної відповіді [1, 3]. Сучасний етап розвитку біотехнології дає змогу в умовах біофабрики здійснювати фракціонування білків мікобактерій і відокремлювати потрібні компоненти за допомогою ультрафільтрації [1, 2, 6].

Технологія методів фракціонування біологічних макромолекул з використанням ультрафільтрації дає змогу видалити з туберкуліну баластні великомолекулярні полісахаридні та ліпопротеїдні фракції й отримати неімуногенні туберкуліни, стандартизовані за молекулярною масою, які містять у своєму складі найспецифічніші фракції протеїнів [1].

Мета роботи — виготовлення дослідних мікросерій туберкуліну для ссавців у стандартному розчині способом ультрафільтрації, які містять у своєму складі специфічні протеїни молекулярною масою до 300 кДа, а також

вивчення активності, специфічності, реактогенності та сенсibiliзувальних властивостей цих препаратів у дослідках на лабораторних і сільськогосподарських тваринах.

Матеріали і методи. У роботі використовували виробничий туберкуліногенний штам *M. bovis* ІЕКВМ-1, який застосовують у виробництві туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців у стандартному розчині на Сумській державній біофабриці. Матричну культуру мікобактерій бичачого виду висівали у 15 бутлів (місткістю по 3 л) на рідке синтетичне живильне середовище Сотона і культивували у термостаті впродовж 60-ти діб при температурі $37\pm 0,5^\circ\text{C}$. Після цього бутлі з вирощеною культурою автоклаували при температурі 132°C 60 хв. Потім бактеріальну масу відокремлювали від культуральної рідини способом фільтрації через стерильні ватно-марлеві фільтри, культуральний фільтрат центрифугували за 3 тис. об./хв — 20 хв.

Одержаний культуральний фільтрат пропускали спочатку через стерилізувальні пластини Зейтца, а потім через мікропористі капронові мембрани і в умовах Сумської державної біофабрики — через порожнисті волокна на установці УПВ-6, які затримують білок молекулярною масою понад 300 кДа. Одержаний в умовах лабораторії ретентат фільтрували на установці УФМ-3-1. Для ультрафільтрації культуральної рідини були використані мікропористі мембрани, які затримують білок з молекулярною масою 10 кДа, 100 і 300 кДа. В отримані напівфабрикати туберкуліну додавали: фенол до його вмісту у препараті 0,3%, гліцерин — 10 і NaCl — 0,85%. Після цього отриманий туберкулін для ссавців у стандартному розчині роз-

Вивчення активності туберкулінів у досліді на великій рогатій худобі, сенсibilізованій культурою вакцинного штаму БЦЖ

№ п/п	Інв. № тварин	Інтенсивність реакцій на туберкулін у тварин, мм			
		Контрольна серія № 2	10 кДа	100 кДа	300 кДа
1	1611	5(10×15)	3(10×13)	9(15×24)	14(10×24)
2	1735	4(10×14)	2(10×12)	4(10×14)	6(10×16)
3	1782	6(11×17)	5(12 ×17)	3(11×14)	5(12×17)
4	1793	6(12×18)	4(12×16)	3(13×16)	4(13×17)
5	4009	3(11×14)	3(11×14)	5(11×16)	6(11×17)
6	4626	7(10×17)	3(10×13)	4(9×13)	4(10×14)
7	1610	4(11×15)	5(9×14)	9(12×21)	11(9×20)
8	1721	5(10×15)	4(9 ×13)	5(10×15)	7(10×17)
9	1838	2(12×14)	4(12×16)	3(13×16)	3(12×15)
10	5001	3(10×13)	5(11×16)	3(9×12)	3(10×13)
M±m		4,5±0,5	3,8±0,3	4,8±0,6	6,3±1,1

фасувували в стерильних умовах у скляні флакони (місткістю по 10 см³), герметично закупорювали і маркували.

У згаданих вище препаратах визначали зовнішній вигляд, стерильність, концентрацію водневих іонів (рН), кількість загального білка (за методом К'ельдаля) [7], а також на морських свинках і великій рогатій худобі (бички віком 1 рік) — біологічну активність (ТО), видову специфічність, реактогенність, відсутність сенсibilізувальних властивостей згідно з методиками, визначеними в ТУ У 24.4-00497087–2001 «Туберкулін очищений (ППД) для ссавців у стандартному розчині». Контролем були комерційні серії ППД-туберкуліну для ссавців у стандартному розчині (серії 64 і 2) та сухий очищений комплексний алерген з атипичних мікобактерій (КАМ, серія 14), виготовлені Сумською державною та Курською біофабриками. Їх застосовують для алергічної діагностики туберкульозу тварин у господарствах України.

Видову специфічність дослідних мікросерій туберкуліну вивчали в досліді на морських свинках, яких сенсibilізували сумішшю скотохромогенних і нефотохромогенних атипичних мікобактерій видів *M. scrofulaceum* (№ 31/82) і *M. intracellulare* (№ 78/98) у дозі 1 мг/см³. Для цього інтенсивність алергічних реакцій (мм) на введення алергенів порівнювали з інтенсивністю реакцій на алерген КАМ.

Результати одержаних дослідів статистично оброблено [5].

Результати досліджень. Отримані експериментальні мікросерії туберкулінів — стерильна прозора рідина світло-коричневого кольору без

механічних домішок. У виготовлених пробах туберкуліну з фракцією білка 10 кДа вміст білка становив 0,3±0,04 мг/мл; 100 кДа — 0,6±0,06 мг/мл; 300 кДа — 0,76±0,03 мг/мл; а туберкулін, виготовлений за стандартною технологією — 1,3±0,04 мг/мл; туберкулін Сумської державної біофабрики — 1,0±0,05 мг/мл. Концентрацію загального білка в алергенах доводили концентруванням за допомогою ПЕГ-6000 до 0,6 мг/мл.

На морських свинках, сенсibilізованих культурою БЦЖ, визначено активність виготовлених туберкулінів, яка становила для туберкуліну з вмістом білка 10 кДа — 39,2 тис. ТО; 100 кДа — 50,8; 300 кДа — 51 тис. ТО. Також у досліді на морських свинках, сенсibilізованих культурами атипичних мікобактерій, враховували інтенсивність алергічних реакцій (мм) порівняно з КАМ, після статистичної обробки інтенсивність алергічних реакцій становила: КАМ — 275 (17,1±0,6), С-64 — 238 (14,8±0,8), 10 кДа — 125,5 (7,8±0,7), 100 кДа — 148 (9,2±0,8), 300 кДа — 158 (9,8±1), ст. тех. — 211,5 (13,2±0,9). Таким чином, доведено, що дослідні мікросерії туберкулінів є специфічними.

У подальшому було проведено порівняльне випробування біологічної активності туберкуліну (ППД) для ссавців у стандартному розчині на клінічно здорових бичках (віком близько 1 року), сенсibilізованих культурою вакцинного штаму БЦЖ, які раніше не реагували на туберкулін. Досліди проводили в благополучному щодо захворювання на туберкульоз господарстві СТОВ «Будильське» Лебединського району Сумської області.

Для випробування використовували виготовлені мікросерії туберкуліну з умістом фракції білка 10 кДа, 100 та 300 кДа. З метою контролю вводили туберкулін (ППД) очищений для ссавців у стандартному розчині (національний стандарт, серія № 2, виготовлений на Сумській державній біофабриці). Облік реакцій на введення алергенів проводили через 72 год після введення (таблиця).

За даними таблиці, найінтенсивнішими були алергічні реакції на туберкулін, що містить білок

молекулярною масою до 300 кДа, потовщення шкірної складки у бичків становило в середньому $6,3 \pm 1,1$ мм. Дещо меншим було потовщення шкіри у тварин після введення туберкуліну, який містить протеїни до 100 кДа — $4,8 \pm 0,6$ мм, а після введення туберкуліну з умістом білка масою до 10 кДа реакції були $3,8 \pm 0,3$ мм. Після ін'єкції контрольного туберкуліну (серія № 2 Сумської державної біофабрики) середня інтенсивність потовщення шкірної складки становила $4,5 \pm 0,5$ мм.

Висновки

Вивчення на великій рогатій худобі біологічної активності експериментальних мікросерій туберкулінів для ссавців свідчить про те, що найбільш виражену специфічну активність має туберкулін із фракцією білків 10–300 кДа. Біологічна активність виготовленої

мікросерії туберкуліну з умістом білка до 10 кДа є вірогідно нижчою, ніж у контрольній серії туберкуліну, виготовленої Сумською державною біофабрикою, що свідчить про потребу виділення низькомолекулярної фракції білка з алергену.

Бібліографія

1. *Безгин В.М.* Новые технологии производства диагностических препаратов для ветеринарной медицины/Безгин В.М., Козлов В.Е.//Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб. — Х., 2002. — Вип. 81. — С. 41–45.
2. *Гурьянов Н.И.* Новый подход к эксплуатации фильтродержателя фирмы «Миллипор»/Н.И. Гурьянов//Ветеринария. — 2002. — № 6. — С. 26–28.
3. *Гущин И.С.* О физиологическом смысле аллергической реакции/И.С. Гущин//Иммунология. — 2001. — № 3. — С. 16–18.
4. *Кассич Ю.Я.* Туберкулез животных и меры борьбы с ним/Ю.Я. Кассич, А.Т. Борзяк, А.Ф. Коч-

- марский и др.//Под ред. Ю.Я. Кассича. — К.: Урожай, 1990. — 304 с.
5. *Лакин Г.Ф.* Биометрия/Г.Ф. Лакин. — М.: Вища шк., 1990. — С. 131–133.
6. *Лысенко А.П.* Получение высокоактивного и специфического аллергена для массовой диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота с помощью ультрафильтрации/А.П. Лысенко, В.М. Безгин, В.Е. Козлов, А.Н. Притыченко//Вет. медицина Беларуси. — 2001. — № 4; 2002. — № 1. — С. 12–14.
7. *Руководство по клиническим лабораторным исследованиям*//Под ред. Л.Г. Смирновой и Е.А. Кост. — М.: Медгиз, 1960. — С. 197–200.