



УКРАЇНА

(19) UA (11) 30988 (13) U

(51) МПК (2006)

A61K 39/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ТУБЕРКУЛІНУ

1

2

(21) u200710950

(22) 03.10.2007

(24) 25.03.2008

(46) 25.03.2008, Бюл.№ 6, 2008 рік

(72) ЗАВГОРОДНІЙ АНДРІЙ ІВАНОВИЧ, UA,
СТЕГНІЙ БОРИС ТИМОФІЙОВИЧ, UA(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
"ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ
ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", UA

(56)

(57) Спосіб виготовлення туберкуліну, що включає
культивування збудника туберкульозу *M. bovis* на

синтетичному живильному середовищі, інактивацію культури, фільтрацію, відокремлення культурального фільтрату, осадження білка трихлороцтовою кислотою, очищення розчином сірчаноокислого амонію і виділення цільового продукту, який **відрізняється** тим, що додатково концентрують на установці УПВ-6 з використанням порожнистих волокон з затримкою білка 15 кДа, осаджують білок 50 % розчином трихлороцтової кислоти у кінцевій концентрації 6 % та стерилізують на установці Sartorius.

Корисна модель відноситься до ветеринарної мікробіології і зокрема до одержання біологічного препарату (туберкуліну) Purifical Protein Derivative, який застосовується для алергічної діагностики туберкульозу сільськогосподарських тварин.

Існує спосіб одержання туберкуліну шляхом вирощування на живильному середовищі мікобактерій туберкульозу, з наступною їх деструкцією, відокремленням культуральної рідини, додаванням формаліну, сорбцією цільового продукту на гідроокису амонію і його стерилізацією шляхом автоклавування [Патент РФ №2053791, А61К39/04 - 1996р.]. Недоліком цього способу є те, що одержаний туберкулін вміщує як низько, так і високо молекулярні білки, які у здорових тварин зумовлюють синтез протитуберкульозних антитіл та неспецифічні алергічні реакції при внутрішньошкірному введенні.

Відомий спосіб виготовлення туберкуліну із культурального фільтрату та дезінтегрованої бактерійної маси *M.bovis* з послідовним осадженням білка 40% розчином трихлороцтової кислоти, діалізом протеїну та триразовою стерилізацією готового продукту у 20см³ флаконах за температури 40-42°C протягом 20 хвилин [Авт. свід. №1339922 від 18.06.85р.]. Недоліком цього способу є тривале культивування *M.bovis* на живильному середовищі, одержання неякісного туберкуліну та низький вихід готового продукту.

Найбільш близьким рішенням до того, що

заявляється, є спосіб одержання туберкуліну шляхом осадження білка у культуральному фільтраті хімічними детергентами з послідовним центрифугуванням, діалізом розчину протеїну через целофанову оболонку і стерилізацією та стабілізацією одержаного препарату при 80-90°C [Авт. свід. 2035914 від 18.01.95р.]. Це рішення може бути прототипом.

Недоліком цього способу є те, що одержаний туберкулін зумовлює у 8-10% тварин неспецифічні реакції, що зменшує його специфічність та вимагає визначення природи таких реакцій з застосуванням додаткових методів досліджень.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб виготовлення туберкуліну, що включає культивування збудника туберкульозу *M.bovis* на синтетичному живильному середовищі, інактивацію культури, фільтрацію, відокремлення культурального фільтрату, осадження білка трихлороцтовою кислотою, очищення розчином сірчаноокислого амонію і виділення цільового продукту шляхом додаткової концентрації на установці УПВ-6 з використанням порожнистих волокон з затримкою білка 15кДа, осадження білка 50% розчином трихлороцтової кислоти у кінцевій концентрації 6% та стерилізації на установці Sartorius, щоб забезпечити ефективність способу.

Порівняльний аналіз способу, що заявляється, та прототипу показує, що спосіб, що заявляється, відрізняється від існуючого тим, що проводять додаткову концентрацію культурального фільтрату

(13) U

(11) 30988

(19) UA

на установці УПВ-6 [Тимонин А.С. Основы конструирования и расчета Химико-технологического и природоохранного оборудования: Справочник / Московский государственный университет инженерной экологии. – Калуга: изд-во Н.Бочкаревой, 2002. – т.2. – 1028с.] з використанням порожнистих волокон 15кДа, осадження протеїну діалізом та стерилізацією готового продукту на установці Sartorius [Биотехнология: Учебник / И.В. Тихонов, Е.А. Рубан, Т.Н. Грязиева и др., под ред. Акад. РАСХН Е.С.Воронина. – СПб.: ГИОРД, 2005. – 792с.], що дозволяє отримати біологічно активний, не реактогенний туберкулін, який не володіє сенсibilізуючими властивостями, що відповідає критерію «Новизна».

Спосіб виконується таким чином:

Збудник туберкульозу *M.bovis* штам IEKBM-1, *M.bovis* штам №4, *M.bovis* штам Vallee культивують на синтетичному живильному середовищі протягом 56-60 діб при температурі 37,5-38°C. Після цього культуру автоклавують при температурі 120°C протягом 1 години. Бактеріальну масу відокремлюють від культурального фільтрату через фільтр-полотно. Одержаний таким чином культуральний фільтрат центрифугують, а потім отриманий центрифугат концентрують до 1:10 попереднього об'єму на установці УПВ-6 з порожнистими волокнами 15кДа та доводять рН до 4,5-4,7. В концентрат додають 50% розчин трихлороцтової кислоти до кінцевої концентрації в культуральному фільтраті 6% і витримують при +4°C протягом 12 годин. Після цього надосадову рідину зливають, а осад розчиняють стерильною дистильованою водою 1:10 при рН розчину білка 7,0-8,0.

Розчин білка переосаджують рівним об'ємом насиченого розчину сульфату амонію при рН 7,0 і витримують 12 годин при температурі +4°C. Надосадову рідину зливають, а осад центрифугують при 3000об/хв. протягом 20 хвилин. Потім осад розчиняють у дистильованій воді у співвідношенні 1:5-1:7, після чого проводять його знесолювання проти дистильованої води. Одержаний концентрат розчину туберкуліну розводять розчином хлористого натрію, що вміщує гліцерин і фенол до вмісту в 1см³ розчину туберкуліну 1мг білка, 0,85% хлористого натрію, 10% гліцерину, 0,3% фенолу.

Виготовлений таким чином стандартний розчин туберкуліну стерилізують на установці Sartorius і в асептичних умовах розливають у стерильні флакони ємністю 10-20см³.

Виготовлений туберкулін перевіряють на активність, сенсibilізуючи властивості з референтною серією (прототип) ППД-туберкуліну для ссавців згідно ГОСТ 16739-88, видову специфічність згідно ТУУ10-19-516-87 Алерген сухий очищений із атипичних мікобактерій (КАМ).

Приклад 1. При перевірці на морських свинках сенсibilізованих живою культурою БЦЖ встановлено, що активність у виготовленого туберкуліну становить 50000ТО/см³, що відповідає вимогам ГОСТ.

Приклад 2. При визначенні видової

специфічності одержаного туберкуліну в порівнянні з еталонною серією туберкуліну ППД для ссавців (Курська біофабрика) на морських свинках, сенсibilізованих сумішшю живих культур атипичних мікобактерій видів *M.scrofulaceum*, *M.intracellulare* встановлено більш виражена видова специфічність на виготовлений туберкулін, ніж на туберкулін Курської біофабрики (прототип). При цьому кількість морських свинок, реагуючих на виготовлений туберкулін становить 6 голів, тоді як на туберкулін (прототип) для ссавців реагувало всі 10 голів. При цьому необхідно відмітити, що інтенсивність внутрішньошкірних реакцій на виготовлений туберкулін у реагуючих морських свинок була менше, ніж на прототип.

Приклад 3. При триразовому внутрішньошкірному введенні здоровим морським свинкам випробуваного туберкуліну з інтервалом 5 діб та через 15 діб після останньої ін'єкції туберкуліну в дозі 500ТО препарату в об'ємі 0,1см³ в жодному випадку не було виявлено реагуючих тварин.

Результати дослідів свідчать про те, що виготовлений за запропонованою технологічною схемою туберкулін є активним (50000ТО), більш видоспецифічним і не володіє сенсibilізуючими властивостями та може застосовуватись для алергічної діагностики туберкульозу у сільськогосподарських тварин (див. Таблицю).

Група тварин	Кількість тварин	Сенсibilізованих мікобактеріями	Активність туберкуліну		Результат
			виготовлений	прототип	
I	10	БЦЖ	50000ТО/мл	50000ТО/мл	10
II	10	Атипичні мікобактерії			6
III	5	Здорові тварини			-

«-» - дослідження не проводились