



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **118590**

(13) **U**

(51) МПК

A61K 39/04 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2017 02842**

(22) Дата подання заявки: **27.03.2017**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.08.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.08.2017, Бюл.№ 15**

(72) Винахідник(и):

**Завгородній Андрій Іванович (UA),
Стегній Борис Тимофійович (UA)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
"ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І
КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ",
вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)**

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ТУБЕРКУЛІНУ

(57) Реферат:

Спосіб виготовлення туберкуліну 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. Культуральний концентрат додатково концентрують на установці УПВ-6 з використанням пустотілих волокон з затримкою білка 15 кДа, осаджують білок 50 % розчином трихлороцтової кислоти у кінцевій концентрації 6 %, переосаджують сульфатом амонію та стерилізують отриманий кінцевий продукт (протеїн) на установці Sartorius.

UA 118590 U

Корисна модель належить 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. А61К 39/04-1996 р.]. Недоліком цього способу є те, що одержаний туберкулін вміщує як низько- так і високомолекулярні білки, які у здорових тварин зумовлюють синтез протитуберкульозних антитіл та неспецифічні алергічні реакції при внутрішньо-шкірному 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 20 см³ флаконах за температури 40 – 42 °С протягом 20 хвилин [Авт. свід. № 1339922 від 18.06.85 р.]. Недоліком цього способу є тривале культивування *M. bovis* на живильному середовищі, одержання неякісного туберкуліну та низький вихід готового продукту.

Найбільш близьким рішенням до заявленого 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 °С [Авт. свід. 2035914 від 18.01.95 р.]. 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 сірчанокислого амонію і виділення цільового продукту шляхом додаткової концентрації культурального фільтрату на установці УПВ-6 з використанням пустотілих волокон з затримкою білка 15 кДа, осадження білка 50 % розчином трихлороцтової кислоти у кінцевій концентрації 6 %, переосадження сульфатом амонію та стерилізації отриманого кінцевого продукту (протеїну) на установці Sartorius, щоб забезпечити ефективність способу.

Порівняльний аналіз заявленого способу та прототипу показує, що заявлений спосіб відрізняється від існуючого тим, що проводять додаткову концентрацію культурального фільтрату 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. - 1028 с.) з використанням пустотілих волокон 15 кДа, 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. - 792 с.), що дозволяє отримати біологічно активний, не реактогенний туберкулін, який не має сенсibiliзуючих властивостей, 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 °С. Після цього культуру автоклавують при температурі 120 °С 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 пустотілими волокнами 15 кДа 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 °С 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 °С. Надосадову рідину зливають, а осад центрифугують при 3000 об/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 1 см³ розчину туберкуліну 1 мг 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 10-20 см³.

Виготовлений туберкулін перевіряють на активність, сенсibilізуючі властивості з референтною серією (прототип) ППД-туберкуліну для ссавців, згідно з ГОСТ 16739-88, видову специфічність, згідно з ТУ У 10-19-516-87 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 50000 ТО/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* встановлена 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 меншою, 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 500 ТО препарату в об'ємі 0,1 см³ в жодному випадку не було виявлено реагуючих тварин.

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

Спосіб виготовлення туберкуліну

Таблиця

Група тварин	Кількість тварин	Сенсibilізованих мікобактеріями	Активність туберкуліну		Реагували м. с. на туберкулін (гол.)			
					Специфічність туберкуліну		Сенсibilізуючі властивості	
			виготовлений	прототип	виготовлений	прототип	виготовлений	прототип
I	10	БЦЖ	50000 ТО/мл	50000 ТО/мл	10	10	-	-
II	10	Атипичні мікобактерії			6	10		
III	5	Здорові тварини			-	-	негативно	негативно

«-» - дослідження не проводились

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

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 культуральний концентрат додатково концентрують на установці УПВ-6 з використанням пустотілих волокон з затримкою білка 15 кДа, осаджують білок 50 % розчином трихлороцтової кислоти у кінцевій концентрації 6 %, переосаджують сульфатом амонію та стерилізують отриманий кінцевий продукт (протеїн) на установці Sartorius.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601