



УКРАЇНА

(19) UA (11) 4222 (13) U

(51) 7 A61K39/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ТУБЕРКУЛІНУ ОЧИЩЕНОГО (ППД) ДЛЯ ПТИЦІ

1

2

(21) 2004031938

(22) 16.03.2004

(24) 17.01.2005

(46) 17.01.2005, Бюл. № 1, 2005 р.

(72) Завгородній Андрій Іванович, Кассіч Юрій Якович, Калашник Наталія Василівна, Позмогова Світлана Аркадіївна, Стегній Борис Тимофійович
(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ(57) Спосіб виготовлення туберкуліну очищеного для птиці, що включає вирощування протеїногенного штаму *M.avium* на синтетичному живильному

середовищі, інактивацію бактеріальної маси, фільтрацію, відокремлення культурального фільтрату з подальшим осаджуванням білка із фільтрату трихлороцтовою кислотою, виділенням цільового продукту, який відрізняється тим, що культуральний фільтрат попередньо концентрують на мембрані, яка затримує білки розміром 15 кДа, а для осаджування білка використовують трихлороцтову кислоту в кінцевій концентрації 6 об. % та додатково очищують сірчанокислим амонієм при pH 7,0-7,2, стерилізують одержаний цільовий продукт на установці Sartorius.

Корисна модель відноситься до ветеринарної мікробіології та біотехнології, а саме до способу виготовлення діагностичного препарату, який застосовується для алергічної діагностики туберкульозу птиці.

Відомі способи одержання туберкуліну, які застосовують для діагностики туберкульозу "Аллерген туберкулезный концентрированный жидкий для кожного применения" (Альттуберкулин - АТ) Харьковского предприятия по производству бактериальных препаратов, 1989, "Сухой очищенный туберкулин (ППД) для млекопитающих" (Патент №2035914 от 18. 01. 1993 г), "Туберкулин очищенный (ППД) для млекопитающих" (ГОСТ - 1988).

Недоліком способів виготовлення цих алергенів є використання органічних розчинників, які погіршують санітарно-гігієнічні умови праці, екологію оточуючого середовища, потребують спеціального обладнання та невеликий вихід готового продукту з одиниці об'єму.

"Туберкулин сухой очищенный (ППД) для птиц" (ГОСТ - 1979). Недоліком цього препарату є те, що осадження білка проводять дегідратами, а вихід готового продукту з 1 л культурального фільтрату 240-280 см³, що складає його собівартість однієї дози до 30-40 копійок.

Найбільш близьким до заявляемого об'єкту є спосіб одержання очищеного туберкуліну для птиці, який являє собою розчин білкових фракцій, виділених хімічним шляхом із культурального фільтрату *M. avium* розчином трихлороцтової (ТХО) кислоти та багаторазовим його переосаджуванням цією кислотою (Авт. дис. на соиск. к.в.н. Гринев

А.А., с.22). Це рішення може бути прототипом.

Недоліком цього способу є велика трудоемкість технологічних процесів, висока собівартість та низький вихід препарату з 1л культурального фільтрату.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб виготовлення туберкуліну очищеного (ППД) для птиці, що включає вирощування протеїногенного штаму *M.avium* на синтетичному живильному середовищі, інактивацію бактеріальної маси, фільтрацію, відокремлення культурального фільтрату з послідовним осаджуванням білка із фільтрату трихлороцтовою кислотою, виділенням цільового продукту, шляхом попереднього концентрування культурального фільтрату на мембрані, яка затримує білки розміром 15 кДа, а для осаджування білка використовують ТХО-кислоту в кінцевій концентрації 6 об% та додатково очищують сірчанокислим амонієм при pH 7,0-7,2, стерилізують одержаний цільовий продукт на установці Sartorius, щоб забезпечити ефективність способу виготовлення туберкуліну очищеного (ППД) для птиці.

Спосіб виконується в такій послідовності: вирощують туберкуліногенний штам мікобактерій пташиного виду, стерилізують культуру, фільтрацією відокремлюють бактеріальну масу, попередньо очищують і концентрують культуральний фільтрат до 1:6-1:10 попереднього об'єму, осаджують білок ТХО-кислотою до кінцевого вмісту в фільтраті 4-8 %, переочищають білок сірчанокислим амонієм при pH - 7,0-7,2, діаліз полуфабрикату і після операції стандартизації проводять сте-

(13) U

(11) 4222

(19) UA

рилізує фільтрацію готового продукту (туберкуліну)

Спосіб, що пропонується, відповідає критерію "Новизна", так як серед доступних літературних джерел інформації, не було виявлено способу виготовлення туберкуліну для птиці з такою сукупністю ознак

Приклад 1 У ємкості з синтетичним живильним середовищем висівають протеїногенну культуру мікобактерій *M avium* і культивують в термостаті при 37,5-38°C протягом 50 діб. Одержану культуру мікобактерій стерилізують автоклавуванням при 102°C протягом 1 години. Потім мікробну завісь фільтрують через марлевий фільтр. Одержаний прозорий культуральний фільтрат концентрують на установці УПВ-6 з порожнистими волокнами 15 кДа при 8°C до 1/6 попереднього об'єму культурального фільтрату. В одержаному концентраті осаджування білка проводять 50% ТХО-кислотою до кінцевої концентрації 4 об. % Одержаний осад білка через 10 годин центрифугують, після чого осадок розчиняють в дистильованій воді із розрахунку 1 частина білка і 10 частин дистильованої води і 10% розчином аміаку доводять розчин білку до рН - 7,0-7,2

Після цього розчин білка змішують з рівним об'ємом насиченого розчину сірчано-кислого амонію і через 8 годин надосадкову рідину видаляють, а осадок розчиняють дистильованою водою в

співвідношенні 1:10 і доводять рН до 7,2

Розчин білка обезсолюють у проточній дистильованій воді протягом 6 годин. Потім проводять стандартизацію продукту шляхом внесення до одержаного розчину білка хлористого натрію - 0,85±0,05, гліцерину - 10,0±1,0, фенолу - 0,3 ±0,1 та стерилізують на установці Sartorius і розливають у флакони по 10 см³

Приклад №2 Теж саме, що і в прикладі №1, тільки концентрацію культурального фільтрату проводять до 1/8 попереднього об'єму

Приклад №3 Теж саме, що і в прикладі №1, тільки концентрацію культурального фільтрату проводять до 1/10 попереднього об'єму

Приклад №4 Теж саме, що і в прикладі №1. Осаджування білка проводять 50% ТХО-кислотою до кінцевої концентрації у фільтраті 6%

Приклад №5 Теж саме, що і у прикладі №2, а осаджування білка проводять 50% ТХО-кислотою до кінцевої концентрації у фільтраті 6%

Приклад №6 Теж саме, що і у прикладі №3, а осаджування білка проводять 50% ТХО-кислотою до кінцевої концентрації 6%

Приклад №7,8,9 Теж саме, що і у прикладі 1,2,3, а осаджування білка проводять 50% ТХО-кислотою до кінцевої концентрації 8 об. % у культуральному фільтраті

Результати проведених досліджень наведені в таблицях 1,2,3,4

Таблиця 1

Показники	Концентрація культурального фільтрату від попереднього об'єму		
	1/6	1/8	1/10
Вміст білка мг/см ³	0,7	0,85	1,0
Вихід цільового продукту із 1л культурального фільтрату, ТО/см ³	46000	48500	52000

Таблиця 2

Варіант	Кінцева концентрація ТХО-кислоти, %	Кількість доз препарату
Пропонуємий	4	280
	6	520
	8	320
Прототип	4	280

Таблиця 3

Вид стерилізації	Вихід цільового продукту із 1л культуральної рідини, ТО/см ³	
	До стерилізації	Після стерилізації
Стерилізуюча фільтрація через фільтр Зейтца	48000 - 52000	37000 - 40000
Стерилізуюча фільтрація на установці Sartorius	48000-52000	47000-51000

Таблиця 4

Показники	Спосіб	
	Пропонуємий	Прототип
Вихід білка мг/см ³	1,0-1	0,75
Кількість доз туберкуліну з 1л культурального фільтрату	520	280
Вихід цільового продукту з 1 літра культуральної рідини, ТО/см ³	47000-51000	37000-40000

Попереднє концентрування культурального фільтрату на ультрафільтраційних мембранах з затримуючою здатністю 15 кДа зменшує об'єм останнього. Дослідами встановлено, що оптимальним значенням ступеню концентрації є 10. При більшій кратності спостерігали значні втрати білка, а менша концентрація немає сенсу, так як збільшуються витрати ТХО-кислоти, необхідної для осадження білка. Зменшення концентрації культурального фільтрату у 10 раз зменшує кількість ТХО-кислоти, необхідної для осадження білка, у 10 раз та в стільки ж разів зменшується кількість луку, яка необхідна для нейтралізації надосадкової рідини.

Це дозволяє зменшити витрати, дефіцитні і дорогі хімікати, поліпшити санітарно-гігієнічні умови праці, зменшити забруднення оточуючого середовища.

При кінцевій концентрації ТХО-кислоти 4% осадження білка не відбувається в повній мірі, а при 8% концентрації кислоти відбувається частко-

ва денатурація білка.

Встановлено, що оптимальною концентрацією для повного осадження білка у культуральному фільтраті є 6% концентрація ТХО-кислоти.

Переосадження (очистка) білка сірчано-кислим амонієм при рН - 7,0-7,2 дозволяє виготовити активний туберкулін.

Стерилізація туберкуліну на установці Sartorius дозволяє збільшити вихід білку і цільового продукту з 1 л культуральної рідини на 10000-11000 ТО/см³.

Визначення специфічності виготовленого туберкуліну проведено на 15 морських свинках, сенсibilізованих гомолопчним штамом пташиного виду і 15 м св -гетеролопчним штамом бичачого виду.

Інтенсивність алергічних реакцій у м свинки на виготовлений туберкулін у гомолопчній системі була достовірно виражена на туберкулін для птиці, а у гетеролопчній системі активність реакцій цього алергену була значно меншою.



УКРАЇНА

(19) UA (11) 4222 (13) U
(51) 7 A61K39/04МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ТУБЕРКУЛІНУ ОЧИЩЕНОГО (ППД) ДЛЯ ПТИЦІ

1

(21) 2004031938

(22) 16.03.2004

(24) 17.01.2005

(46) 17.01.2005, Бюл. № 1, 2005 р.

(72) Завгородній Андрій Іванович, Кассіч Юрій Якович, Калашник Наталія Василівна, Позмогова Світлана Аркадіївна, Стегній Борис Тимофійович
(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ(57) Спосіб виготовлення туберкуліну очищеного для птиці, що включає вирощування протеїногенного штаму *M.avium* на синтетичному живильному

2

середовищі, інактивацію бактеріальної маси, фільтрацію, відокремлення культурального фільтрату з подальшим осаджуванням білка із фільтрату трихлороцтовою кислотою, виділенням цільового продукту, який відрізняється тим, що культуральний фільтрат попередньо концентрують на мембрані, яка затримує білки розміром 15 кДа, а для осаджування білка використовують трихлороцтову кислоту в кінцевій концентрації 6 об. % та додатково очищують сірчанокислим амонієм при рН 7,0-7,2, стерилізують одержаний цільовий продукт на установці Sartorius.

Корисна модель відноситься до ветеринарної мікробіології та біотехнології, а саме до способу виготовлення діагностичного препарату, який застосовується для алергічної діагностики туберкульозу птиці.

Відомі способи одержання туберкуліну, які застосовують для діагностики туберкульозу "Аллерген туберкулезный концентрированный жидкий для кожного применения" (Альттуберкулин - АТ) Харьковского предприятия по производству бактериальных препаратов, 1989, "Сухой очищенный туберкулин (ППД) для млекопитающих" (Патент №2035914 от 18. 01. 1993 г), "Туберкулин очищенный (ППД) для млекопитающих" (ГОСТ - 1988).

Недоліком способів виготовлення цих алергенів є використання органічних розчинників, які погіршують санітарно-гігієнічні умови праці, екологію оточуючого середовища, потребують спеціального обладнання та невеликий вихід готового продукту з одиниці об'єму.

"Туберкулин сухой очищенный (ППД) для птиц" (ГОСТ - 1979). Недоліком цього препарату є те, що осадження білка проводять дегідратантами, а вихід готового продукту з 1 л культурального фільтрату 240-280 см³, що складає його собівартість однієї дози до 30-40 копійок.

Найбільш близьким до заявляемого об'єкту є спосіб одержання очищеного туберкуліну для птиці, який являє собою розчин білкових фракцій, виділених хімічним шляхом із культурального фільтрату *M. avium* розчином трихлороцтової (ТХО) кислоти та багаторазовим його пересаджуванням цією кислотою (Авт. дис. на соиск. к.в.н. Гринев

А.А., с.22). Це рішення може бути прототипом.

Недоліком цього способу є велика трудомісткість технологічних процесів, висока собівартість та низький вихід препарату з 1л культурального фільтрату.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб виготовлення туберкуліну очищеного (ППД) для птиці, що включає вирощування протеїногенного штаму *M.avium* на синтетичному живильному середовищі, інактивацію бактеріальної маси, фільтрацію, відокремлення культурального фільтрату з послідовним осаджуванням білка із фільтрату трихлороцтовою кислотою, виділенням цільового продукту, шляхом попереднього концентрування культурального фільтрату на мембрані, яка затримує білки розміром 15 кДа, а для осаджування білка використовують ТХО-кислоту в кінцевій концентрації 6 об% та додатково очищують сірчанокислим амонієм при рН 7,0-7,2, стерилізують одержаний цільовий продукт на установці Sartorius, щоб забезпечити ефективність способу виготовлення туберкуліну очищеного (ППД) для птиці.

Спосіб виконується в такій послідовності: вирощують туберкуліногенний штам мікобактерій пташиного виду, стерилізують культуру, фільтрацією відокремлюють бактеріальну масу, попередньо очищують и концентрують культуральний фільтрат до 1:6-1:10 попереднього об'єму, осаджують білок ТХО-кислотою до кінцевого вмісту в фільтраті 4-8 %, переочищають білок сірчанокислим амонієм при рН - 7,0-7,2, діаліз полуфабрикату і після операції стандартизації проводять сте-

(19) UA (11) 4222 (13) U

рилізуючу фільтрацію готового продукту (туберкуліну).

Спосіб, що пропонується, відповідає критерію "Новизна", так як серед доступних літературних джерел інформації, не було виявлено способу виготовлення туберкуліну для птиці з такою сукупністю ознак.

Приклад 1. У ємкість з синтетичним живильним середовищем висівають протеїногенну культуру мікобактерій *M. avium* і культивують в термостаті при 37,5-38°C протягом 50 діб. Одержану культуру мікобактерій стерилізують автоклавуванням при 102°C протягом 1 години. Потім мікробну завісь фільтрують через марлевий фільтр. Одержаний прозорий культуральний фільтрат концентрують на установці УПВ-6 з порожнистими волокнами 15 кДа при 8°C до 1:6 попереднього об'єму культурального фільтрату. В одержаному концентраті осаджування білка проводять 50% ТХО-кислотою до кінцевої концентрації її в фільтраті 4 об. %. Одержаний осад білка через 10 годин центрифугують, після чого осадок розчиняють в дистильованій воді із розрахунку 1 частина білка і 10 частин дистильованої води і 10% розчином аміаку доводять розчин білку до pH - 7,0-7,2.

Після цього розчин білка змішують з рівним об'ємом насиченого розчину сірчаноокислого амонія і через 8 годин надосадкову рідину видаляють, а осадок розчиняють дистильованою водою в

співвідношенні 1:10 і доводять pH до 7,2.

Розчин білка обезсолюють у проточній дистильованій воді протягом 6 годин. Потім проводять стандартизацію продукту шляхом внесення до одержаного розчину білка хлористого натрію - 0,85±0,05, гліцерину - 10,0±1,0, фенолу - 0,3 ±0,1 та стерилізують на установці Sartorius і розливають у флакони по 10 см³.

Приклад №2. Теж саме, що і в прикладі №1, тільки концентрацію культурального фільтрату проводять до 1:8 попереднього об'єму.

Приклад №3. Теж саме, що і в прикладі №1, тільки концентрацію культурального фільтрату проводять до 1:10 попереднього об'єму.

Приклад №4. Теж саме, що і в прикладі №1. Осаджування білка проводять 50% ТХО-кислотою до кінцевої концентрації у фільтраті 6%.

Приклад №5. Теж саме, що і у прикладі №2, а осаджування білка проводять 50% ТХО-кислотою до кінцевої концентрації у фільтраті 6%.

Приклад №6. Теж саме, що і у прикладі №3, а осаджування білка проводять 50% ТХО-кислотою до кінцевої концентрації 6%.

Приклад №7,8,9. Теж саме, що і у прикладі 1,2,3, а осаджування білка проводять 50% ТХО - кислотою до кінцевої концентрації 8 об.% у культуральному фільтраті.

Результати проведених досліджень наведені в таблицях 1,2,3,4.

Таблиця 1

Показники	Концентрація культурального фільтрату від попереднього об'єму		
	1:6	1:8	1:10
Вміст білка мг/см ³	0,7	0,85	1,0
Вихід цільового продукту із 1л культурального фільтрату, ТО/см ³	46000	48500	52000

Таблиця 2

Варіант	Кінцева концентрація ТХО-кислоти, %	Кількість доз препарату
Пропонуємий	4	280
	6	520
	8	320
Прототип	4	280

Таблиця 3

Вид стерилізації	Вихід цільового продукту із 1л культуральної рідини, ТО/см ³	
	До стерилізації	Після стерилізації
Стерилізуюча фільтрація через фільтр Зейтца	48000 - 52000	37000 - 40000
Стерилізуюча фільтрація на установці Sartorius	48000-52000	47000-51000

Таблиця 4

Показники	Спосіб	
	Пропонуємий	Прототип
Вихід білка мг/см ³	1,0-1	0,75
Кількість доз туберкуліну з 1л культурального фільтрату	520	280
Вихід цільового продукту з 1 літра культуральної рідини, ТО/см ³	47000-51000	37000-40000

Попереднє концентрування культурального фільтрату на ультрафільтраційних мембранах з затримуючою здатністю 15 кДа зменшує об'єм останнього. Дослідами встановлено, що оптимальним значенням ступеню концентрації є 10. При більшій кратності спостерігали значні втрати білка, а менша концентрація немає сенсу, так як збільшуються витрати ТХО-кислоти, необхідної для осадження білка. Зменшення концентрації культурального фільтрату у 10 раз зменшує кількість ТХО-кислоти, необхідної для осаджування білка, у 10 раз та в стільки ж разів зменшується кількість луку, яка необхідна для нейтралізації надосадкової рідини.

Це дозволяє зменшити витрати, дефіцитні і дорогі хімікати, поліпшити санітарно-гігієнічні умови праці, зменшити забруднення оточуючого середовища.

При кінцевій концентрації ТХО-кислоти 4% осаджування білка не відбувається в повній мірі, а при 8% концентрації кислоти відбувається частко-

ва денатурація білка.

Встановлено, що оптимальною концентрацією для повного осаджування білка у культуральному фільтраті є 6% концентрація ТХО-кислоти.

Переосадження (очистка) білка сірчанокислим амонієм при рН - 7,0-7,2 дозволяє виготовити активний туберкулін.

Стерилізація туберкуліну на установці Sartopus дозволяє збільшити вихід білку і цільового продукту з 1 л культуральної рідини на 10000-11000 ТО/см³.

Визначення специфічності виготовленого туберкуліну проведено на 15 морських свинках, сенсibilізованих гомологічним штамом пташиного виду і 15 м св-гетерологічним штамом бичачого виду.

Інтенсивність алергічних реакцій у м свинки на виготовлений туберкулін у гомологічній системі була достовірно виражена на туберкулін для птиці, а у гетерологічній системі активність реакцій цього алергену була значно меншою.

y

i

r
r

-

L

2

-