

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 1 ” березня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ШУБИНОЇ Катерини Русланівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання біомаси *Staphylococcus aureus* для виробництва анатоксин-вакцини протистафілококової

керівник роботи ПЕНЧУК Юрій Миколайович, доц., к.т.н.,

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28 березня 2023 року № 193-к

2. Строк подання здобувачем роботи 31 травня 2023 р.

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Staphylococcus aureus* SA564-аспА::ermB, цільовий продукт: біомаса

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) 4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Розділ 1. Характеристика анатоксин-вакцини протистафілококової; Розділ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента; Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування; Розділ 4. Біосинтез цільового продукту; Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми; Розділ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу; Розділ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу; Розділ 8. Контроль виробництва; Розділ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва; Розділ 10. Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема ділянки виробничого біосинтезу біомаси – 1 аркуш формату А1; Апаратурна схема ділянки виробничого біосинтезу біомаси – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата а	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 01 березня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Характеристика анатоксин-вакцини протистафілакокової	01.03.2023 – 05.03.2023	
2	РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	06.03.2023 – 11.03.2023	
3	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	12.03.2023 – 17.03.2023	
4	РОЗДІЛ 4. Біосинтез цільового продукту	18.03.2023 – 23.03.2023	
5	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми	24.03.2023 – 05.04.2023	
6	РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	06.04.2023 – 15.04.2023	
7	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	16.04.2023 – 23.04.2023	
8	РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	24.04.2023 – 26.04.2023	
9	РОЗДІЛ 9. Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва	27.04.2023 – 31.04.2023	
10	РОЗДІЛ 10. Нормативно-технічна документація, використана під час проектування виробництва	01.05.2023- 12.05.2023	
11	Оформлення пояснювальної записки	13.05.2023- 20.05.2023	
12	Виконання графічної частини роботи	21.05.2023- 31.5.2023	

Здобувач _____
(підпис)

Катерина ШУБІНА _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Юрій ПЕНЧУК _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційну роботу присвячено розробці біотехнологічного виробництва анатоксин-вакцини протистафілококової. Наразі, в Україні відсутні вакцини такого типу проти стафілококової інфекції. Ситуацію погіршує той факт, що дане захворювання в загальному лікується за допомогою антибіотиків, що призводить до антибіотикорезистентності.

Найбільшу загрозу несе золотистий стафілокок. Саме його штами призводять до гострих та тяжких станів захворювання. Пов'язано це з тим, що саме ці мікроорганізми дуже швидко розвивають резистентність до антибіотиків. Прикладом може бути метицилін-резистентні штами, які наразі лікуються лише комбінованою антибіотикотерапією, що також є поганим шляхом до набуття нової резистентності. Саме тому, наразі пропонується застосовувати івакцини проти стафілококів, щоб сповільнити це явище, а також упезпечити групу ризику, до якої, по більшій частині, відносяться люди літнього віку (80-89 років).

Як біологічний агент було обрано рекомбінантний штам *Staphylococcus aureus* SA564-аспА::ermВ який синтезує 1,3 г/л токсину та 6,26 г/л біомаси. При цьому, вартість за 1 г токсину становить 24,87 грн. Порівняння вели в першу чергу за токсином, оскільки воно є більш показовим, ніж порівнювати концентрацію біомаси.

Оскільки в Україні наразі відсутні анатоксин-вакцини проти стафілококів, за розрахованим проектом було визначено потребу, яка складає 208 664 осіб на рік. Річна потреба в анатоксині становить 1,085 кг. Кількість трудоднів визначено як 250 днів, а об'єм робочого ферментеру становить 10 л.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, десяти розділів, списку використаних джерел, який містить 78 посилань. Загальний обсяг роботи – 97 сторінок, 9 рисунків, 14 таблиць. Графічна частина роботи містить технологічну та апаратурну схеми, які накреслені по одному листу формату А1.

Ключові слова: анатоксини, вакцина протистафілококова, *Staphylococcus aureus*, стафілококова інфекція, резистентність до антибіотиків.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	5
ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1	11
ХАРАКТЕРИСТИКА АНАТОКСИН-ВАКЦИНИ ПРОТИСТАФІЛАКОКОВОЇ.....	11
1.1. Характеристика анатоксинів.....	11
1.2. Хвороби, що виникають через стафілококи.....	12
1.3. Білки, які пропонується використовувати в анатоксин-вакцині.....	13
1.4. Механізм дії токсинів	15
1.5. Виробництво анатоксин-вакцини протистафілококової.....	15
1.6. Випробування анатоксин-вакцини протистафілококової.....	16
РОЗДІЛ 2	22
ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	22
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	22
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	27
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Staphylococcus aureus</i>	28
2.4. Таксономічний статус <i>Staphylococcus aureus</i>	30
РОЗДІЛ 3	31
ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	31
3.1. Потреба у анатоксин-вакцині протистафілококовій.....	31
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	35
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	37
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	37
РОЗДІЛ 4	39
БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	39
4.1. Шляхи катаболізму глюкози в <i>Staphylococcus aureus</i>	39
4.2. Біотрансформація глюкози у біомасу <i>Staphylococcus aureus</i>	40

РОЗДІЛ 5	42
ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	42
5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	42
5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера ...	42
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	44
5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів	45
5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	58
РОЗДІЛ 6	62
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	62
РОЗДІЛ 7	64
ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	64
РОЗДІЛ 8	73
КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	73
8.1. Мікробіологічний контроль	73
8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	75
8.2.1. Концентрація біомаси	75
8.2.2. Концентрація токсину	75
8.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту	76
РОЗДІЛ 9	79
АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА	79
9.1. Системи знешкодження рідких відходів	79
9.2 Системи знешкодження газоподібних відходів	81
9.3. Системи знешкодження та утилізації твердих відходів	81
РОЗДІЛ 10	83
НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА	83

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	86
ДОДАТКИ.....	95

ВСТУП

Протягом останнього десятиліття інфекційні хвороби справили значний вплив на статистику захворюваності й смертності населення і вимагали значних витрат коштів національних органів охорони здоров'я. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) сьогодні доступні вакцини проти більш ніж 26 інфекційних захворювань. В арсеналі імунопрофілактики налічується понад 60 ефективних вакцинних препаратів, різних за складом, способом застосування й ефективністю. Проте удосконалення заходів імунопрофілактики, новітні методики розробки з метою підвищення ефективності, конструювання генно-інженерних вакцин з використанням вірусоподібних часток, створення вакцин рослинного походження, а також нових ад'ювантів (речовин, що підвищують імуногенність акцинних препаратів) є важливим питанням сучасної імунології [1].

Дослідження у напрямі отримання вакцин генно-інженерними методами ведуться у багатьох лабораторіях світу. Досягнуто значних успіхів у здійсненні експресії в бактеріях та дріжджах генів, що кодують поверхневі білки вірусу грипу, гепатиту В, поліовірусу, вірусів сказу, ящуру та ін. Однак висока вартість виробництва нових вакцин і юридичні питання, що стосуються можливості їх застосування, суворі регулятивні правила стосовно імунізації здорових людей і досить обмежений дохід від виробництва вакцин є суттєвими перешкодами, які утримують фармацевтичні компанії від вступу у вакцинний бізнес [1].

Тому останніми роками кількість виробників вакцин значно зменшилася, що призвело до зниження конкуренції і зацікавленості до інвестування в цю галузь. Сьогодні у практичній системі охорони здоров'я застосовують вакцини, розроблені багато років тому, але удосконалені з розвитком імунології через необхідність підвищення їх безпеки, переносимості й ефективності. В результаті з'явилися продукти з поліпшеними характеристиками, але виробництво яких неможливе без ускладнення технологічних процесів. Водночас застосовують

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.42 КР ПЗ</i>		
		<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Шубіна К.Р.</i>			<i>ВСТУП</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Пенчук Ю.М.</i>					9	97 9
<i>Реценз.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>							
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>						

деякі розроблені десятки років тому препарати (наприклад, вакцину проти грипу, досі отримують за допомогою застарілих методів) [1].

Тому актуальністю даної роботи є підбір ефективного продуцента для створення вакцини на основі стафілококового анатоксину, що одержують за допомогою сучасних технологічних процесів, значними обсягами й зі швидкістю, яка дає змогу задовольнити існуючі потреби при заходах масової вакцинації.

Новизною даної роботи є використання мутантного штаму *Staphylococcus aureus SA564-acnA::ermB*, що синтезує 1,3 г/л токсину на середовищі TSB за 12 годин культивування [2]

РОЗДІЛ 1
ХАРАКТЕРИСТИКА АНАТОКСИН-ВАКЦИНИ
ПРОТИСТАФІЛАКОКОВОЇ

1.1. Характеристика анатоксинів

Анатоксин, синонім токсод — токсин, знешкоджений шляхом спеціальної обробки. Анатоксин. — вид вакцин, який використовують для активної імунопрофілактики токсинемічного інфекційного захворювання. Термін введений Г. Рамоном (Франція) у 1923 р., коли він, досліджуючи вплив 0,4% розчину формаліну при Т 38–40 °С на дифтерійний токсин, одержав імуногенний препарат, позбавлений токсичних властивостей [3].

Анатоксин виготовляють з екзотоксинів: екзотоксин піддають обробці 0,3–0,8% розчином формаліну у нейтральному середовищі при Т 35–40 °С протягом 3–4 тижнів. У результаті такої обробки токсини повністю втрачають токсичні властивості, але зберігають антигенні й імуногенні. Потім анатоксин очищають від баластних речовин, концентрують і адсорбують на гідроксиді алюмінію або інших сорбентах. Після перевірки отриманого препарату на стерильність, нешкідливість і активність анатоксин використовують для імунізації. Активність препарату визначають у реакції нейтралізації токсину антитоксином та реакції флокуляції, виражаючи в міжнародних одиницях (МО) [3].

Анатоксин застосовують для формування активного антитоксичного імунітету та створення лікувально-профілактичних антитоксичних сироваток. Використовують очищений адсорбований дифтерійний анатоксиин, очищений адсорбований правцевий анатоксиин, очищений адсорбований стафілококовий анатоксиин, адсорбований дифтерійно-правцевий анатоксиин. Правцевий і дифтерійний анатоксиин входять до складу асоційованої коклюшно-дифтерійно-правцевої вакцини, холероген-анатоксин — до складу холерної вакцини [3].

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.42 КР ПЗ</i>		
		<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Шубіна К.Р.</i>			РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА АНАТОКСИН-ВАКЦИНИ ПРОТИСТАФІЛАКОКОВОЇ	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Пенчук Ю.М.</i>					11	97
<i>Реценз.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>					11		
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>						

Стафілококовий токсин є ентеротоксином, який вважається необхідним рецептор у кишечнику. Він має нейротоксичний ефект, який діє на центр блювоти в головному мозку. При стафілококовому харчовому отруєнні початок симптомів часто різкий. Блювота є найбільш помітним симптомом, зазвичай виникає між 2 і 4 годинами, але може тривати від 30 хвилин до 8 годин після їжі. Також часто спостерігаються нудота, спазми в животі та діарея. Як правило, як і у випадку з більшістю токсинів, чим вища концентрація токсину (або чим більша кількість проковтнутого), тим коротший інкубаційний період і тим сильніші симптоми. Індивідуальна сприйнятливість також є визначальним фактором тяжкості. Хвороба зазвичай завершується протягом одного-двох днів, але бувають випадки смерті, іноді внаслідок гострої гіпотензії (ще один добре відомий, але рідкісний ефект токсину) [4].

Існує фармакопейна стаття, що поширюється на анатоксин стафілококовий очищений адсорбований, і алюмінію або іншому дозволеному для застосування мінеральному адсорбенті [5].

При підшкірному введенні анатоксин стафілококовий очищений адсорбований викликає утворення специфічних антитіл (антитоксинів) до стафілококового екзотоксин [5].

Область застосування [5]:

- профілактика стафілококових інфекцій у осіб з підвищеним ризиком захворювання (промислові та сільськогосподарські робітники, що зазнають за своєю діяльністю частого травматизму), а також у хворих, які мають планові операції;

- імунізація донорів з метою отримання антистафілококової плазми та виготовлення антистафілококового імуноглобуліну.

1.2. Хвороби, що виникають через стафілококи

Staphylococcus aureus є дуже універсальним збудником, який викликає широкий спектр внутрішньолікарняних і позалікарняних інфекцій. У в'язнів, спортсменів, військовослужбовців та інших груп ризику спостерігалися спалахи

позалікарняних інфекцій шкіри та м'яких тканин (SSTI) через стійкий до метициліну *S. aureus* (MRSA) [6].

S. aureus став серйозною проблемою громадського здоров'я для збройних сил США за останнє десятиліття, впливаючи на військовослужбовців під час навчання та закордонного розгортання. Сукупні показники SSTI під час навчання коливаються між 4-6% і SSTI, за оцінками, були причиною 41 951 амбулаторні візити та 1054 госпіталізації для діючих військових у 2014 році. Оцінка бенефіціарів Міністерства оборони (2005-2010) повідомила про загальний скоригований рівень захворюваності (на 100 000 людей) 4,3 для *S. aureus* бактеріємії та 144,5 для *S. aureus* SSTI. Серед активного персоналу рівень захворюваності на MRSA SSTI склав 280,6 порівняно з 165,8 для метицилін-чутливих *S. aureus* [6].

1.3. Білки, які пропонується використовувати в анатоксин-вакцині

У зв'язку зі зростаючим захворювання *S. aureus*, підвищенням резистентності до антибіотиків і обмеженою ефективністю протоколів деколонізації існує значний інтерес до розробки вакцини проти *S. aureus* для використання в групах високого ризику. Хоча ефективна вакцина проти *S. aureus* залишається важкодосяжною, існує загальний консенсус щодо мультиантигенного підходу до розробки вакцини, яка спрямована на відповідь Т- і В-клітин на компоненти клітинної поверхні *S. aureus*, фактори вірулентності та токсини [6].

α -токсин і лейкоцидин Пантона-Валентина (PVL) є двома токсинами, які представляють інтерес для підходу на основі анатоксинів, які показали ефективність на моделях на тваринах. α -токсин є висококонсервативним токсином, який викликає порушення тканинного бар'єру на інтерфейсах господаря, вистелених епітеліальним або ендотеліальних клітин і підриває імунну відповідь господаря. Зменшення розміру ураження шкіри та дермонекроз спостерігалися у мишей, імунізованих нетоксигенною формою α -токсину, після інфікування USA300. У обсерваційних дослідженнях вищі рівні антитіл IgG до α -токсину були пов'язані зі зниженим ризиком сепсису у дорослих пацієнтів з інвазивними стафілококовими інфекціями. Крім того, тривале спостереження за дітьми з

інвазивним захворюванням *S. aureus* виявило захисний зв'язок між титрами антитіл до α -токсину та рецидивом інфекції [6].

PVL є пороутворюючим цитотоксином, що складається з 2 субодиниць, LukS-PV і LukF-PV, які викликають руйнування лейкоцитів і некроз тканин. Велика частка метицилінрезистентних (MRSA) штами, які викликають інвазивні позалікарняні інфекції, такі як некротичні інфекції шкіри та м'яких тканин і некротизуюча пневмонія, є позитивними на ген PVL. Дослідження, що оцінюють роль PVL як фактора вірулентності, виявляють складну взаємодію між фактором вірулентності та організмом-господарем. імунна відповідь. Дані *in vitro* свідчать про те, що на ранніх стадіях інфекції або з нижчим інокулятом збудника субцитолітичні концентрації PVL активують вроджену імунну систему, таким чином надаючи захисний ефект проти інфекції. Антитіла проти PVL посилюють вірулентність PVL, нейтралізуючи цей прозапальний ефект у субцитолітичних концентраціях, таким чином обмежуючи їх роль у профілактиці захворювання. У обсерваційних дослідженнях особи, інфіковані PVL-позитивними штамми *S. aureus*, мають вищі рівні антитіл проти PVL порівняно з пацієнтами з PVL-негативними інфекціями *S. aureus* або без інфекції *S. aureus*, але захисна роль цієї імунної відповіді у людей не встановлена. Навпаки, деякі мишачі моделі припускають, що антитіла проти PVL можуть відігравати певну роль у зменшенні тяжкості або захисту від інфекції [6].

Підшкірна ін'єкція rLukS-PV або rLukF-PV значно покращила виживаність після легеневої інфекції MRSA USA 300 і знизила захворюваність після дермальної інфекції USA 300.34 Захист від сепсису USA300 було продемонстровано на мишачій моделі з використанням вакцини, що складається з сильно ослаблених форм субблоків PVL (rLukS-PV або rLukF-PV) [6].

Альфа-гемолізін, ентеротоксини А і В були обрані в якості протективних антигенів для об'єднання в потрібний антигенний химерний білок (НАВ). Імуноінформаційний аналіз передбачив білок НАВ як відповідний кандидат на вакцину для індукції як гуморальної, так і клітинної імунної відповіді. Третинна структура білка НАВ була передбачена та підтверджена за допомогою

обчислювальних підходів. Були проведені дослідження стикування між білком НАВ і рецептором TLR2 мишей. Було виявлено, що химерний білок потрійного антигену (r-НАВ) має високу імуногенність у миші, оскільки гіперімунна сироватка анти-r-НАВ була сильно реактивною до всіх трьох нативних екзотоксинів на вестерн-блоттингу. Аналіз нейтралізації токсинів *in vitro* з використанням антитіл до r-НАВ продемонстрував > 75% нейтралізації токсинів на лінії клітин RAW 264.7. Активна імунізація анатоксином r-НАВ дала ~ 83% захисту від 2 × летальної дози секретованих екзотоксинів. Захист опосередковувався індукцією сильних відповідей антитіл, які нейтралізували токсини. Пасивна імунізація антитілами до r-НАВ забезпечила ~ 50% захисту від летального зараження. На завершення тестування *in vitro* та *in vivo* r-НАВ показало, що молекула є нетоксичною, має високу імуногенність і індукує чудовий захист від нативних токсинів у групах активно імунізованих і частково імунізованих мишей [7].

1.4. Механізм дії токсинів

Добре відомо, що суперантигени стафілококового пірогенного токсину з'єднують варіабельну частину b-ланцюга рецептора Т-лімфоцитів (Vb-TCR) з a-та/або b-ланцюгом молекул головного комплексу гістосумісності класу II (МНС II).. Це перехресне з'єднання призводить до активації та проліферації великого відсотка (до 50%) Т-клітин і активації антигенпрезентуючих клітин, причому останні найчастіше розглядаються як активація макрофагів. Чистим ефектом є масове вироблення цитокінів, або вперше описаний так званий цитокіновий шторм, коли інтерлейкін-1b викликає високу температуру (102°F), а фактор некрозу пухлини альфа (TNF-a) і TNF-b спричиняє капілярний витік і, як наслідок, артеріальна гіпотензія (систоличний артеріальний тиск 90 мм рт.ст.), шок і, можливо, смерть [8].

1.5. Виробництво анатоксин-вакцини протистафілококової

При виробництві анатоксину стафілококового очищеного використовують штам *Staphylococcus aureus* O15 (або інший штам стафілокока, що має аналогічні властивості), депонований в офіційній колекції, походження та історія якого документовані. При культивуванні на рідких поживних середовищах штам повинен

утворювати екзотоксин (синоніми: токсин стафілококовий, альфатоксин, альфастафілоліз) [5].

Метод культивування повинен забезпечувати високу продукцію токсину, зберігати гемолітичні властивості штаму та унеможливити контамінацію штаму сторонньою мікрофлорою. Токсинвмісна культуральна рідина, звільнена від мікробних клітин і продуктів їх розпаду, повинна містити токсин стафілококовий з гемолітичною активністю не менше 500 ДНМ (мінімальна гемолітична доза) і мати Lh (ліміт гемолітичної дії) токсину не більше 0,4 мл.

Спосіб детоксикації токсину стафілококового повинен гарантувати відсутність токсичності та можливість її реверсії за збереження антигенної (не менше 2 ЕС/мл) та імуногенної (здатність викликати утворення специфічних антитіл) активності анатоксину стафілококового. Наступна концентрація повинна забезпечити вміст 1 мл концентрату не менше 30 ЕС (одиниць зв'язування). Для виробництва анатоксину стафілококового адсорбованого проводять сорбцію отриманого концентрованого анатоксину, додаючи необхідну (розрахункову) кількість гідроксиду алюмінію. Сорбція має бути повною [5].

Для характеристики анатоксину стафілококового очищеного адсорбованого суспензії для підшкірного введення визначають: рН, час седиментаційної стійкості, розмір частинок, дисперсність, стерильність, аномальну токсичність, специфічну нешкідливість, специфічну активність, повноту сорбції, вміст формальдегіду, адсорбенту та консерванту [5].

1.6. Випробування анатоксин-вакцини протистафілококової

Опис. Суспензія білого кольору з жовтуватим відтінком, що розділяється при стоянні на прозору надосадову рідину і пухкий осад, що повністю диспергується при струшуванні. Визначення проводять візуально [5].

Справжність. Повинен викликати утворення антитіл до стафілококового токсину. Визначення проводять відповідно до ОФС «Визначення вмісту антиальфастафілолізину (специфічних антитіл) у препаратах крові людини та тварин» [5].

Об'єм, що видобувається. Не менш за номінальний. Нормативні вимоги зазначають у нормативній документації. Визначення проводять відповідно до ОФС «Обсяг обсягу лікарських форм для парентерального застосування» [5].

pH. Від 6,2 до 7,4 (якщо немає інших вказівок у нормативній документації). Визначення проводять потенціометрично з нерозведеним препаратом відповідно до ОФС «Іонометрія» [5].

Час седиментаційної стійкості. Після струшування не повинно спостерігатися розшарування протягом 2,5 хв [5].

Розмір частинок. Повинен вільно проходити в шприц через голку №0840. Визначення проводять відповідно до ОФС «Лікарські форми для парентерального застосування» [5].

Дисперсність. Показник дисперсності від 06 до 14. Визначення проводять фотометрично при розведенні препарату 1:1 0,9% розчином хлориду натрію відповідно до вказівок у нормативній документації [5].

Стерильність. Препарат має бути стерильним. Визначення проводять методом прямого сівби відповідно до ОФС «Стерильність» [5].

Аномальна токсичність. Препарат має бути нетоксичним. Білим мишам (5 тваринам) масою тіла 18–20 г препарат вводять внутрішньочеревно по 0,5 мл, 2 морським свинкам масою 250–300 г – підшкірно по 2 мл. Препарат вважають таким, що витримав випробування, якщо [5]:

- протягом 7 діб спостереження всі тварини залишилися живими і в жодної з тварин не були виявлені видимі ознаки захворювання;
- у жодної з тварин не відзначено втрату маси тіла;
- у жодної морської свинки в місці введення препарату не розвинувся абсцес або некроз.

Якщо протягом періоду спостереження реєструють загибель хоча б 1 тварини, захворювання, зменшення маси тіла або пошкодження в місці ін'єкції, повторюють випробування на подвоєній кількості тварин при тих же умовах обліку досвіду. Повторне випробування вважають задовільним, якщо препарат відповідає вищезазначеним вимогам [5].

Специфічна нешкідливість. Препарат має бути нешкідливим. Кролику масою 2 - 2,5 кг препарат вводять підшкірно по 2,5 мл в обидва боки. Препарат вважають таким, що витримав випробування, якщо протягом 5 діб спостереження кролик залишається здоровим, і в місцях введення препарату відсутні явища некрозу тканин [5].

Специфічна активність (імуногенність). Повинен викликати утворення специфічних антитіл при підшкірному введенні (зміст антиальфастафілолізину – специфічних антитіл) у сироватках крові імунізованих кроликів має бути не менше 3 МО на 1 мл (середньоарифметичне значення). Кроликам (3 тваринам) масою $(2,0 \pm 0,5)$ кг препарат вводять в обсязі 0,5 мл підшкірно дворазово з інтервалом 17 – 20 діб. Через 8 – 10 діб після останньої імунізації у кроликів беруть кров із крайової вени вуха та визначають у сироватці крові кожної імунізованої тварини вміст антиальфастафілолізину. Визначення проводять відповідно до ОФС «Визначення антиальфастафілолізину (специфічних антитіл) у лікарських препаратах із сироватки крові людини та тварин» [5].

Примітка: для проведення випробувань за показниками «Специфічна нешкідливість» та «Специфічна активність (імуногенність)» використовують кроликів, які містять не більше 0,125 МО антиальфастафілолізину в 1 мл сироватки крові. Визначення проводять відповідно до ОФС «Визначення вмісту антиальфастафілолізину (специфічних антитіл) у лікарських препаратах із сироватки крові людини та тварин» [5].

Повнота сорбції. Сорбція стафілококового анатоксину має бути повною. Насадкова рідина не повинна містити вільного стафілококового анатоксину. Допускається наявність в 1 мл надосадової рідини не більше 0,2 ЕС антиальфастафілолізину (1 ЕС являє собою мінімальну кількість анатоксину, яке пов'язує 1 МЕ (Міжнародна одиниця) антиальфастафілолізину) [5].

Для постановки реакції використовують такі інгредієнти [5]:

- випробуваний анатоксин стафілококовий;
- стандартний зразок (СО) антиальфастафілолізину із встановленим вмістом стафілококових антитіл (МЕ/мл);

- токсин стафілококовий, гемолітичні властивості якого характеризуються величиною Lh (ліміт гемолітичної дії - мінімальна кількість токсину стафілококового, яке, будучи пов'язане з 1 МО антиальфастафілолізину, викликає майже повний (+++) гемоліз еритроцитів кролика);

- 15% завись еритроцитів кролика;
- 0,9% розчин хлориду натрію.

Для визначення повноти сорбції в 4 пробірки (дослідний ряд) наливають надосадову рідину випробуваного препарату: в першу пробірку – 1 мл нерозведеної надосадової рідини, в інші пробірки вносять по 1 мл надосадової рідини, розведеної 0,9% розчином натрію хлориду відповідно 2, 5, 10 раз. У кожен пробірку додають по 1 мл розчину СО антиальфастафілолізину, розведеного до вмісту 0,2 МО/мл. Пробірки обережно струшують і витримують 20 хв за нормальної температури 18 – 20 °С [5].

Проведення випробування супроводжується 4 контролями:

Перший контроль (пробірка № 1) – контроль «повноти» нейтралізації Lh токсину стафілококового в умовах випробування. У пробірку вносять 1 мл СО антиальфастафілолізину, що містить 0,2 МО/мл антиальфастафілолізину і додають 1 мл 0,9 % розчину натрію хлориду.

Другий контроль (пробірка № 2) – контроль за відсутністю спонтанного лізису еритроцитів кролика. У пробірку вносять 2 мл 0,9% натрію розчину хлориду.

Третій контроль (пробірка № 3) – контроль гемолітичної дії токсину стафілококового в умовах випробування. У пробірку вносять 2 мл 0,9% натрію розчину хлориду.

Четвертий контроль (пробірка № 4) – контроль відсутності лізису еритроцитів надсадковою рідиною. У пробірку вносять 2 мл надосадової рідини випробуваного зразка.

У пробірки дослідного ряду та контрольні пробірки № 1 та № 3 додають токсин стафілококовий у дозі Lh/10. У контрольні пробірки №2 та №4 токсин не додають. Усі пробірки струшують та витримують 20 хв при температурі (20 ± 2)°С. Далі в кожен пробірку додають по 2 краплі (0,1 мл) 15% суспензії еритроцитів,

приготовленої в день випробування; пробірки знову струшують і витримують протягом 1 години при температурі $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, а потім - 1 год при температурі $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Результати випробування враховують візуально за ступенем гемолізу еритроцитів. У першому, другому та четвертому контролі гемоліз еритроцитів повинен бути відсутнім. Відсутність гемолізу у першому контролі свідчить про те, що 0,2 МЕ антиальфастафілолізину повністю нейтралізували гемолітичну дію дози токсину стафілококового в умовах випробування; відсутність гемолізу в четвертому контролі свідчить про те, що "цілісна" нерозведена надосадова рідина не викликає гемолізу еритроцитів кролика; у третьому контролі має відбутися повний гемоліз еритроцитів. У пробірках дослідного ряду ознак гемолізу не повинно бути [5].

Наявність ознак гемолізу в дослідному ряді означає присутність в надосадовій рідині вільного стафілококового анатоксину, який пов'язує антиальфастафілоліз, і токсин стафілококовий, що залишився вільним, викликає гемоліз еритроцитів кролика.

Виробничий штаб. Розділ повинен містити таку інформацію: найменування штаму(ів); місце депонування; морфологічну характеристику; за необхідності – допустима кількість пасажів та методику їх проведення із зазначенням субстрату та умов культивування; додаткові до паспортних даних вимоги до характеристик штабів.

Формальдегід. Не більше ніж 30 мкг/мл. Випробування проводять за ОФС "Кількісне визначення формальдегіду в імунобіологічних лікарських препаратах".

Консерванти. Тіомерсал (якщо немає інших вказівок у нормативній документації). Вміст тіомерсалу має бути від 80 до 120 мкг/мл. Випробування проводять за ОФС "Кількісне визначення тіомерсалу в імунобіологічних лікарських препаратах".

Сорбенти. Алюмінію гідроксид (якщо немає інших вказівок у нормативній документації). Вміст іонів алюмінію має становити від 0,9 до 1,3 мг/мл.

Випробування проводять за ОФС "Визначення іонів алюмінію в сорбованих імунобіологічних лікарських препаратах".

Показники, які відображають якість кінцевого продукту, але не можуть бути визначені, повинні бути визначені на проміжних стадіях виробництва, що також має бути зазначено у нормативній документації.

Пакування та маркування. Відповідно до ОФС «Імунобіологічні лікарські препарати».

Транспортування та зберігання. За температури від 2 до 8 °С. Заморожування не допускається [5].

РОЗДІЛ 2
ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА
БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

Невдачі, пов'язані з неефективністю вакцин у клінічних випробуваннях, на думку дослідників, визначаються трьома основними причинами: критичною імуногенністю антибактеріальної вакцини, що призводить до дефіциту вироблення антитіл, зокрема до нестачі функціональних антитіл; відсутність відповідності мішеней селекціонованих антигенів патогенезу інфекції; неадекватним відбором груп пацієнтів щодо ефективності вакцин [9].

При розробці ефективних протистафілококових препаратів переважно відбувається пошук можливих протективних білкових та полісахаридних компонентів.

Оскільки механізми вірулентності *S. aureus* включають споживання необхідних поживних речовин, адгезію на тканинах господаря та імунну евазію, що нейтралізує захист господаря від розвитку інвазивних стафілококових інфекцій, вакцини повинні мати здатність блокувати ці механізми. Разом з тим профілактичні вакцини, що пропонувалися, на основі одиничних антигенів, двох капсульних полісахаридів або залізорегульованого білка IsdB, виявилися недостатньо ефективними в клінічних випробуваннях, що, як припустили, пояснюється їх впливом на одиничний механізм вірулентності.

Впровадження у практику нової оригінальної вітчизняної стафілококової вакцини сприятиме ефективній профілактиці та лікуванню пацієнтів з гнійно-септичними позалікарняними інфекціями та пов'язаними з наданням медичної допомоги, а також зниженню формування антибіотикостійких форм мікроорганізмів [9].

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.42 КР ПЗ</i>		
		<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Шубіна К.Р.</i>			РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Пенчук Ю.М.</i>					22	97
<i>Реценз.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>							
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>						

Тому необхідним є підбір найкращого продуцента анатоксину для розробки протистафілокової вакцини.

Somerville зі співавторами дослідили можливість синтезу δ -токсину диким та мутантним штамми *S. aureus* [2]. Ізогенний мутантний штам з інактивованою аконітазою *S. aureus* SA564-*acnA::ermB* було створено з початкового *S. aureus* SA564. Культивування штамів здійснювали в аеробних умовах за температури 37 °C при забезпеченні перемішування 225 об/хв за рН 6 протягом 12 годин. Середовищем для біосинтезу δ -токсину слугував триптон-соевий бульйон (TSB) [10] з додаванням 50 мМ глютамату (г/л):

Глюкоза – 2,5;

Триптон – 17,0;

Соевий пептон – 3,0;

NaCl – 5,0;

K₂HPO₄ – 2,5;

Глутамат – 9.

По закінченню культивування визначили, що початковий штам *S. aureus* SA564 синтезує цільовий продукт у кількості 0,84 мг/мл, тоді як концентрація δ -токсину, синтезованого мутантом *S. aureus* SA564-*acnA::ermB* є більшою та становить 1,3 мг/мл. Також виявили, що токсин містить один глютамін, але не містить глютаматних залишків. Таким чином, припустили, що ауксотрофія глютамату, може опосередковано впливати на синтез δ -токсину [2].

У 2019 році автори статті [11] повідомили про позитивний вплив проведення спільного культивування продуцента α -токсину *S. aureus* з дріжджами роду *Candida*. Культури вирощували за умов аерації при температурі 37 °C при перемішуванні у режимі 200 об/хв за рН 6 протягом 16 годин. Культури вирощували у триптон-соевому бульйоні [10], що має такий склад (г/л):

Глюкоза – 2,5;

Триптон – 17,0;

Соевий пептон – 3,0;

NaCl – 5,0; K₂HPO₄ – 2,5.

Порівняльна характеристика продуцентів стафілококового токсину

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація токсину, г/л	Час культивування, год	Параметри біосинтезу	Література
<i>S. aureus</i> SA564	Глюкоза – 2,5; Триптон – 17,0; Соевий пептон – 3,0; NaCl – 5,0; K ₂ HPO ₄ – 2,5; Глутамат – 9.	0,84	12	Аеробні умови, за температури 37 °С при забезпеченні перемішування 225 об/хв, рН 6	Greg A. Somerville, Alan Cockayne, Manuela Dürr, Andreas Peschel, Michael Otto, James M. Synthesis and Deformylation of <i>Staphylococcus aureus</i> δ -Toxin Are Linked to Tricarboxylic Acid Cycle Activity. <i>JOURNAL OF BACTERIOLOGY</i> . 2003, 185(22): 6686–6694 [2].
<i>S. aureus</i> SA564- acnA::ermB	Глюкоза – 2,5; Триптон – 17,0; Соевий пептон – 3,0; NaCl – 5,0; K ₂ HPO ₄ – 2,5; Глутамат – 9.	1,3	12	Аеробні умови, за температури 37 °С при забезпеченні перемішування 225 об/хв, рН 6	Greg A. Somerville, Alan Cockayne, Manuela Durr, Andreas Peschel, Michael Otto, James M. Synthesis and Deformylation of <i>Staphylococcus aureus</i> δ -Toxin Are Linked to Tricarboxylic Acid Cycle Activity. <i>JOURNAL OF BACTERIOLOGY</i> . 2003, 185(22): 6686–6694 [2].
<i>S. aureus</i> (pDB22)	Глюкоза – 2,5; Триптон – 17,0; Соевий пептон – 3,0; NaCl – 5,0; K ₂ HPO ₄ – 2,5.	0,0059	16	Аеробні умови, при температурі 37 °С при перемішуванні у режимі 200 об/хв, рН 6	Todd Olivia A., Noverr Mairi C., Peters Brian M., Mitchell Aaron P. <i>Candida albicans</i> Impacts <i>Staphylococcus aureus</i> Alpha-Toxin Production via Extracellular Alkalinization. <i>mSphere</i> . 2019, 4(6): 1-12. doi:10.1128/msphere.00780-19 [10].

Було показано, що за культивування *S. aureus* (pDB22) у середовищі з *C. albicans* SC5314 концентрація α -токсину в супернатанті культуральної рідини становила 5,9 мкг/мл. У сукупності результати цього дослідження підкреслюють динамічну та складну природу міжмікробних взаємодій з одночасним підвищенням рівня адаптації продуцента токсину до умов навколишнього середовища [10].

Узагальнена інформація щодо порівняння вищенаведених штамів-продуцентів стафілококового токсину представлено у табл. 2.1.

Виходячи з даних, наведених у табл. 2.1, найменшу кількість токсину продукував штам *S. aureus* (pDB22) – 5,9 мкг/мл, тобто 0,0059 г/л, при цьому тривалість культивування цього штаму була найвищою. Мутантний штам *S. aureus* SA564-*acnA::ermB* синтезував набагато більше (1,3 г/л) токсину, при цьому тривалість його вирощування була на 4 години меншою.

На наступному етапі розрахуємо та порівняємо вартість поживних середовищ для культивування штамів *S. aureus* (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для отримання стафілококового токсину

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1,2,3)*
<i>Staphylococcus aureus</i> SA564	Глюкоза – 2,5;	18	0,045	1
	Триптон – 17,0;	1816,62	30,88	2
	Соєвий пептон – 3,0;	259,52	0,78	3
<i>Staphylococcus aureus</i> SA564- <i>acnA::ermB</i>	NaCl – 5,0;	9,2	0,046	4
	K ₂ HPO ₄ – 2,5;	150	0,375	5
	Глутамат – 9.	23	0,207	6
Вартість 1 л середовища становить – 32,33 грн				
<i>Staphylococcus aureus</i> (pDB22)	Глюкоза – 2,5;	18	0,045	1
	Триптон – 17,0;	1816,62	30,88	2
	Соєвий пептон – 3,0;	259,52	0,78	3
	NaCl – 5,0;	9,2	0,046	4
	K ₂ HPO ₄ – 2,5.	150	0,375	5
Вартість 1 л середовища становить – 32,13 грн				

Примітка: * – ціни наведено з урахуванням ПДВ станом на травень 2023 року

1 – <https://flagma.ua/glyukoza-dekstroza-o2394980.html>

- 2 – <https://russian.alibaba.com/p-detail/Best-1600603137273.html?spm=a2700.8699010.29.36.67806e4aAX5k3O>
- 3 – <https://russian.alibaba.com/p-detail/AUVO-1600613416211.html?spm=a2700.8699010.29.91.41f677348wMq3l>
- 4 – <https://prom.ua/p1637267411-sol-pischevaya-pomol.html?&primelead=MC40MjU>
- 5 – <https://runainter.com/ua/p260995616-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>
- 6 – <https://banka-speciy.in.ua/ingridienti/glutamat-natriya-e-621>

Так, з огляду на розрахунки вартості поживних середовищ, результати яких представлено у табл. 2.2, можна підсумувати, що вартість поживних середовищ є практично однаковою, середовище для культивування *S. aureus* (pDB22) виявилось дещо дешевшим, оскільки воно не містило глютаму.

Тому ця інформація не є достатньою для вибору найкращого біологічного агента і на наступному етапі слід вирахувати умовну вартість 1 г цільового продукту – табл. 2.3.

Таблиця 2.3

**Умовна вартість 1 г токсину для отримання анатоксину
стафілококового**

Продуцент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація токсину, г/л	Умовна вартість 1 г токсину, грн	Час культивування, год	Кількість токсину, синтезованого за год, г/л
<i>S. aureus</i> SA564	32,33	0,84	38,49	12	0,07
<i>S. aureus</i> SA564-<i>acnA::ermB</i>	32,33	1,3	24,87	12	0,10
<i>S. aureus</i> (pDB22)	32,13	0,0059	5445,76	16	0,0004

Згідно розрахунків, поданих у табл. 2.3, вкрай дорогим виявився 1 г токсину, синтезованого *S. aureus* (pDB22), а найменшу вартість склав 1 г цільового продукту, синтезований мутантом *S. aureus* SA564-*acnA::ermB*. Разом з тим, кількість токсину, синтезованого за годину, була найвищою також у штаму *S. aureus* SA564-*acnA::ermB*.

Тому виходячи з показників найвищого рівня синтезу токсину та найнижчої умовної вартості 1 г цільового продукту, найкращим продуцентом для отримання стафілококового анатоксину є мутантний штам *S. aureus* SA564-*acnA::ermB*.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Процес біосинтезу триває 12 год, концентрація токсину становить 1,3 г/л. Проте, кінцевим продуктом культивування є біомаса, концентрація якої чітко невідома. Тому, маємо виконати розрахунок цього параметру.

Одержаний токсин – це білок. Білки на 50-55% складаються з карбону та на 9-15% з азоту [12]. Отже, можемо прорахувати кількість цих компонентів, яка потрібна для синтезу 1,3 г/л токсину. Беремо усереднене значення вуглецю – 52,5% та азоту – 12%. Тоді, необхідна кількість карбону становить: $1,3 \times 0,525 \approx 0,68$ г, при цьому 40% йде на окиснення, тоді кількість вуглецю становить: $0,68 \times 0,4 + 0,68 = 0,952$ г. Кількість азоту, яка потрібна становить $1,3 \times 0,12 = 0,156$ г.

В середовищі основним джерелом карбону виступають глюкоза, триптон та соєвий пептон. На 180 г глюкози припадає 72 г карбону (перерахунок за молекулярною масою, формула - $C_6H_{12}O_6$). В середовищі кількість глюкози становить 2,5 г, з них $2,5 \times 72 / 180 = 1$ г, цієї кількості вже достатньо для синтезу токсину, проте маємо прорахувати весь карбон, для того, щоб точно знати, як кількість припадає на біомасу. В триптоні міститься 43,9% карбону [13], отже, враховуючи, що в середовищі міститься 17 г, кількість карбону становить $17 \times 0,439 = 7,463$ г, а в пептоні його кількість становить 41,87% [13], отже, кількість карбону з пептону - $3 \times 0,4187 = 1,256$ г. Отже, загальна кількість карбону становить: $1 + 1,256 + 7,463 \approx 9,72$ г. Враховуючи кількість, що припадає на синтез анатоксину, кількість залишкового вуглецю становить: $9,72 - 0,952 = 8,768$ г.

Щодо азоту, основними джерелами є триптон, соєвий пептон та глютамат. Кількість азоту в триптоні становить 12,59 %, в пептоні – 14,34% [13]. Отже, кількість азоту з цих компонентів становить $17 \times 0,1259 \approx 2,14$ г та $3 \times 0,1434 \approx 0,43$ г. На 147 г глютамату (молекулярна маса) припадає 14 г азоту (хімічна формула $C_5H_9NO_4$), тоді кількість азоту в 9 г становить $9 \times 14 / 147 \approx 0,86$ г. Загальна кількість азоту становить: $2,14 + 0,43 + 0,86 = 3,43$ г. Залишкова кількість азоту, з врахуванням того, що треба синтезувати анатоксин, становить: $3,43 - 0,156 = 3,274$ г.

Біомаса складається на 50% з карбону, при цьому потрібно врахувати, що 40% йде на окиснення. Кількість залишкового карбону становить 8,768 г. Для

легшого розрахунку, припускаємо, що з 8,768 г одержується $8,768 \times 0,5 = 4,384$ г. Для такої кількості біомаси потрібна кількість вуглецю становить: $4,384 \times 0,4 + 4,384 = 6,1376$ г вуглецю. Оскільки кількість вуглецю в середовищі більша, можемо скласти пропорцію, за якою вираховуємо концентрацію біомаси: $8,768 \times 4,384 / 6,1376 \approx 6,26$ г біомаси може утворитися за карбоном в 1 літрі поживного середовища.

Кількість азоту в бактеріальній клітині становить 10%, а кількість залишкового азоту становить 3,274 г. Отже, кількість біомаси, що може синтезуватись з азоту становить $3,274 \times 100 / 10 = 32,74$ г. Звісно, такої концентрації бактеріальної маси в поживному середовищі не буде, оскільки ріст продуцента буде лімітуватись джерелами карбону.

Отже, кінцева концентрація біомаси становить 6,26 г/л.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Staphylococcus aureus*

Під мікроскопом виглядають як грампозитивні, нерухомі коки розміром 0,8-1 мкм. Вони є неспоронні. Зустрічаються гронами, що нагадують виноград [14].

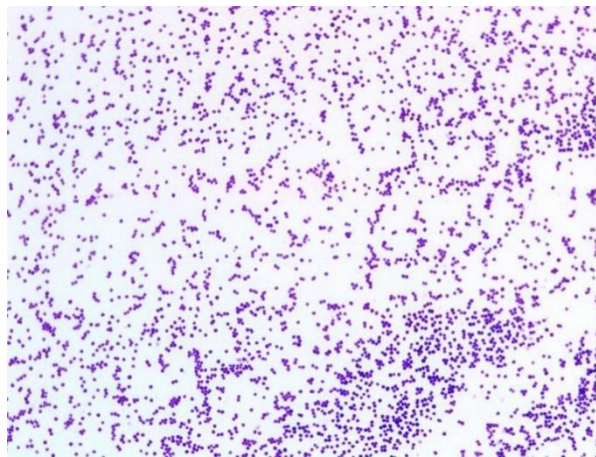


Рис.2.1. Грампозитивні коки *S. aureus*, пофарбовані за Грамом під мікроскопом при збільшенні 10X [15]

Через 48 годин інкубації колонії круглі, непрозорі, жовтуваті, діаметром 0,5-2 мм, S-типу, часто гемолітичні на кров'яному агарі. Можуть синтезувати капсули. Інкапсульовані штами зазвичай утворюють менші та більш опуклі колонії.

Температурний діапазон росту 10-45 °С; оптимальна 30-37 °С. Факультативно анаеробний [14].



Рис.2.2. Колонії *S. aureus* на солодовому агарі (зліва) та на кров'яному агарі (справа) [16]

S. aureus має позитивні результати для лужної фосфатази, коагулази, DN-ази, FDP-альдолази класу 1, термостабільної нуклеази, гіалуронідази, уреазу, виробництва кислоти з фруктози та сахарози [14].

Негативні результати для бета-галактозидази, бета-глюкуронідази, оксидази, виробництва кислоти з арабінози, целобіози, мелезитози, рафінози, саліцину, ксиліту та ксилози [14].

S. aureus — факультативні анаероби, краще ростуть в аеробних умовах. За типом живлення хемоорганотроф. Ці бактерії розщеплюють вуглеводи та спирти, не утворюють індол, не відновлюють нітрати до нітритів, не продукують уреазу та нітразу, не використовують цитрат як єдине джерело вуглецю [17].

Основною тестовою реакцією на використання в ідентифікації стафілокока є тест-реакція коагулази, яка поділяє рід *Staphylococcus* на 2 групи — негативні види коагулазу і позитивні види коагулазу. Резистентний до пеніциліну через пеніцилін зв'язуючий білок та метициліну, але піддається дії цефазоліну, нафциліну або оксациліну, ванкоміцину, даптоміцину, телаванцину [17].

Крім антибіотиків, життєдіяльність *S. aureus* пригнічують також фізичні чинники : пряме сонячне світло діє згубно на них протягом 10 — 12 год, сухий жар

— 110 °C — протягом 2 год, 150 °C — протягом 10 хв. Організм доволі стійкий до різних дезінфікатів, не піддається дії навіть 100% етилового спирту, перекису водню [17].

Росте на живильних середовищах при температурі 35-40 ° C (можливе зростання в інтервалі 6,5-46° C), оптимум рН 7,0-7,5. Отже, за відношенням до температури *Staphylococcus aureus* є мезофільним мікроорганізмом, а за відношенням до рН – нейтрофільним [18].

До живильних середовищ невибагливий, добре культивується на простих середовищах таких як: Шоколадний кров'яний агар та Кров'яний агар. Додавання до живильного середовища глюкози або крові прискорює ріст стафілокока.

Характерна властивість більшості штамів — здатність рости в присутності 15 % хлориду натрію або 40 % жовчі [18].

Організм часто гемолітичний в кров'яному агарі завдяки виробництву чотирьох типів гемолізинів (альфа, бета, гамма і дельта). Майже всі ізоляти *S. aureus* виробляють фермент коагулазу [19].

2.4. Таксономічний статус *Staphylococcus aureus*

Філогенетичну класифікацію для *S. aureus* наведено відповідно до наданої інформації у Вікіпедії.

Домен: *Bacteria*

Тип: *Firmicutes*

Клас: *Bacilli*

Ряд: *Bacillales*

Родина: *Staphylococcaceae*

Рід: *Staphylococcus*

Вид: *Staphylococcus aureus* [20]

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у анатоксин-вакцині протистафілококовій

Стафілококи – це бактерії роду *Staphylococcus*, що належать до родини *Staphylococcaceae*. Вони є поширеними у всьому світі й характеризуються різноманітною локалізацією: від шкірних покривів до поверхні слизової оболонки людини та тварин [21].

S. aureus (стафілокок золотистий) є найбільш небезпечним, він патогенний як для людини, так і для тварин [21];

S. epidermidis (стафілокок епідермальний), патогенний для людини і тварини, в основному вражає шкіру, але може викликати гострі реакції при зниженні імунітету, іноді може викликати запалення внутрішньої оболонки серця [21];

S. saprophyticus (стафілокок сапрофітний), патогенний лише для людей, може призводити до загальної інтоксикації організму, часто є збудником запалення уретри та сечового міхура, особливо небезпечний для жінок [21];

Гемолітичний стафілокок вражає верхні дихальні шляхи та викликає гнійну ангіну, фарингіт, тонзиліт, бронхіт та інші запальні захворювання. Крім інфікування, має здатність до гемолізу (руйнування крові). Локалізується у важкодоступних місцях тіла: складки шкіри, пах, пахви і промежині. Гемолітичний *Staphylococcus* викликає безліч захворювань, в основному це гнійні ураження внутрішніх органів, карбункулоз, абсцес і септичне ураження крові [21].

Золотистий стафілокок здатний спровокувати близько 120 захворювань - від легких дерматологічних проблем до інфекційно-токсичного шоку. Також цей мікроорганізм є основною причиною спалахів внутрішньолікарняної інфекції і розвитку післяопераційних ускладнень [22].

					<i>НУХТ БТЕК 04.03.42 КР ПЗ</i>			
		<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>					
<i>Розроб.</i>	<i>Шубіна К.Р.</i>				РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Пенчук Ю.М.</i>						31	97
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

Бактерія стійка в навколишньому середовищі. Вона може до 12 годин знаходитися в умовах повного сонячного освітлення, здатна протягом 10 хвилин витримувати температуру в 1500С, не гине в етиловому спирті і перекису водню [22].

Золотистий стафілокок входить до складу умовно-патогенної мікрофлори шкірних покривів і слизових людського організму. Однак він не провокує захворювань, поки не проникне в системний кровотік. Але навіть цього не завжди достатньо. Головним поштовхом до розвитку інфекційного процесу служить зниження імунітету [22].

Передача мікроорганізму відбувається або через безпосередній контакт, або повітряно-крапельним шляхом. І лише зрідка через продукти харчування (м'ясо, риба, яйця, молочні продукти) і медичний інструментарій [22].

Крім бактерії, хворобу можуть спровокувати її токсини, зокрема це [22]:

- інфекційно-токсичний шок;
- гастроентерит (харчова токсикоінфекція);
- синдром ошпареної шкіри.

Сама ж бактерія здатна вражати різні органи і системи, тому клінічна картина залежить від того, яке захворювання вона викликала [22].

Шкіра. Піодермії - фолікуліт, фурункули, карбункули, гідраденіт, вульгарний сикоз, гнійні рани [22].

Дихальна система. Гострі та хронічні синусити, риніт, ларингіт, бронхіт, пневмонія, тонзиліт і фарингіт [22].

Опорно-рухова система. Гострий і хронічний остеомієліт, септичний артрит [22].

Сечостатева система. Цистит, нефрит, вульвовагініт, епідидиміт [22].

Нервова система. Менінгіт [22].

Кров. Сепсис [22].

Серцево-судинна система. Гострий інфекційний ендокардит [22].

Органи зору. Кон'юнктивіт [22].

Стафілококова інфекція — група різноманітних за клінічними ознаками інфекційних хвороб, які спричиняють стафілококи. Ці хвороби переважно характеризуються наявністю гнійно-запальних вогнищ та інтоксикацією. Бактерії роду *Staphylococcus* — це нерухомі, грампозитивні бактерії кулястої форми діаметром 0,5-1,5мкм. Вони діляться в кількох площинах, утворюючи скупчення у вигляді грон винограду. Золотисті стафілококи утворюють мікрокапсулу [21].

У лабораторіях використовують здатність стафілококів розмножуватися в середовищах зі значним вмістом хлориду натрію (6-10 %). Таку концентрацію солі інші бактерії не витримують, внаслідок чого сольові середовища є селективними для стафілококів. Також діагностичне значення має здатність зброджувати глюкозу й маніт в анаеробних умовах. Стафілококи виявляють високу біохімічну властивість. Їх специфічною родовою властивістю є ферментація глюкози в анаеробних умовах з утворенням лактату [21].

Стафілококи є резистентними до факторів навколишнього середовища: вони витримують висушування, є стійкими до повторного замороження/розмороження, до дії прямого сонячного світла та нагрівання, витримують сухий жар до 2 годин, також зберігаються на часточках пилу. Проте вони чутливі до антисептиків та дезінфектантів: при дії 3 % фенолу гинуть за 10-15 хвилин, проте стійкі до дії етанолу [21].

Велику небезпеку являють екзогенні стафілококові інфекції для хворих у стаціонарах — внутрішньолікарняні (госпітальні) інфекції. Основними їх збудниками є *S. aureus*, *S. epidermidis*. Найбільшу епідемічну небезпеку становить медичний персонал лікувально-профілактичних установ — постійні (резидентні) носії госпітальних штамів [21].

Небезпеку становить також досить висока сприйнятливість до стафілококів, оскільки вражаються хворі з імунodefіцитом різного походження (операція, травма, цукровий діабет і т. ін.) [21].

Лікування стафілококової інфекції полягає в поєднанні антибіотиків та інших медичних засобів, в залежності від локалізації запального процесу. Наприклад, при стафілококовому ураженні в горлі, призначається обробка слизової

антисептиками (наприклад, хлорофіліптом), імуностимулюючі препарати, стафілококовий бактеріофаг [23].

Одночасно з медикаментозним лікуванням, необхідно приймати санітарно-гігієнічні заходи, спрямовані на недопущення поширення інфекції [23]:

- дезінфекція предметів побуту;
- вологе прибирання приміщень;
- споживання свіжої та якісної їжі, чистої води;
- дотримання правил особистої гігієни і т. д.

Розвиток стійкості *S. aureus* до багатьох антибіотиків включає набуття детермінантів шляхом горизонтального перенесення генів мобільних генетичних елементів. Ці детермінанти могли розвинути у виробників антибіотиків, щоб захистити їх від потенційно інгібіторних молекул, або в їхніх конкурентів. Аналіз резистентного ґрунту показує, що бактерії, стійкі до антибіотиків, широко поширені [23].

Резистентність також може виникнути через мутації, які змінюють сайти зв'язування ліків на молекулярних мішенях, і через збільшення експресії ендогенних ефлюкських насосів. Розвиток резистентності через мутацію в принципі можна зменшити за допомогою комбінацій інгібіторів, які націлені на різні сайти, або для двох або більше мутацій, необхідних для того, щоб резистентність перевищила контрольну точку МІС. Стійкість до ванкоміцину вимагає до шести мутацій у різних генах, які призводять до ремоделювання клітинної оболонки для зменшення доступу ліків до летальної мішені [23].

Тому, лікування антибіотиками починає відходити на другий план, а як альтернативу пропонується використовувати протистафілококові вакцини. Анатоксин стафілококовий як раз застосовується для специфічної імунотерапії гострої або хронічної (в стадії загострення) стафілокової інфекції у дорослих [24].

Донедавна, в Україні були присутні анатоксин-вакцини проти стафілококу російського походження. Проте, після повномасштабного вторгнення ці медикаменти придбати неможливо. Зараз в українських аптеках неможливо

придбати анатоксин-вакцини проти стафілококу від будь-якого виробника. В самій країні ще досі не налагоджено виробництво такої вакцини. Тому можна стверджувати про необхідність розробки виробництва вітчизняного лікарського засобу [25].

3.2. Розрахунок потужності виробництва

Захворюваність на стафілококову інфекцію по всьому світі становить близько 20-50 випадків на 100000 населення [26]. Інфікуватися даним захворюванням можна у будь-якому віці, проте найбільша група ризику складають люди віком 80-89 років [27].

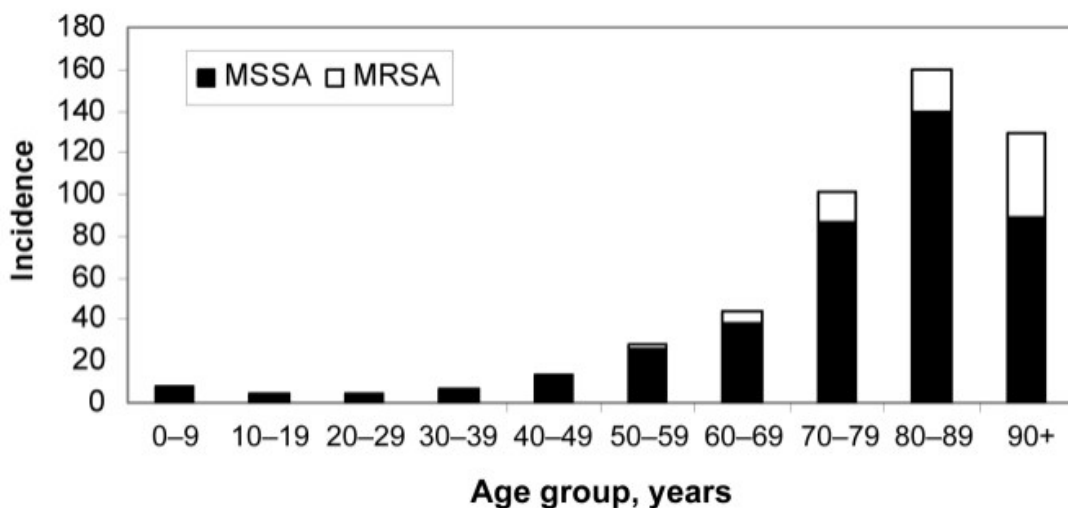


Рис.3.1. Графіка захворюваності штамми золотистого стафілокока за рік, який найчастіше за все є причиною гострої стафілококової інфекції, проти якої не діють антибіотики [27]

Спираючись на рис.3.1. можна знехтувати числом пацієнтів віком до 19 років, оскільки вакцину можна вводити лише дорослим людям, оскільки кількість випадків на ці групи не досягає і 10.

Отже, оскільки кількість випадків становить 20-50 випадків на 100000 населення, пропонується виконувати розрахунок 50 заражених людей на 100000 випадків, через те, що в Україні довгий час антибіотики можна було вільно придбати в найближчій аптеці. Кількість населення України станом на 2023 рік становить 41 732 779 людей [28]. Тоді, кількість випадків на все населення становитиме:

$$\frac{41\,732\,779 \times 500}{100\,000} = 208\,664 \text{ людей/рік}$$

Повний курс лікування містить 7 ін'єкцій препарату, що проводять через 2 дні, у наростаючій дозі: 0,1 — 0,3 — 0,5 — 0,7 — 0,9 — 1,2 — 1,5 мл [24]. Отже, кількість вакцини за весь курс, яка припадає на 1 людину становить:

$$0,1 + 0,3 + 0,5 + 0,7 + 0,9 + 1,2 + 1,5 = 5,2 \text{ мл}$$

Кількість вакцини, яка потрібна для забезпечення всіх хворих становить:

$$208\,664 \times 5,2 = 1\,085\,052 \text{ мл} \approx 1\,085 \text{ л}$$

Концентрація анатоксину в 1 мл становить 1 мг анатоксину [29]. Тоді, загальна кількість анатоксину становить :

$$1\,085\,000 \times 1 = 1\,085 \text{ г}$$

Концентрація анатоксину в культуральній рідині становить 1,3 г/л [2]. Тоді, кількість культуральної рідини на рік має становити:

$$\frac{1085}{1,3} = 835 \text{ л}$$

Враховуючи, що даний білок застосовується для вакцини, яку потім будуть вводи підшкірно, маємо врахувати його ступінь очистки, що буде становити близько 40%. Тоді, кількість культуральної рідини на рік становить:

$$835 \times 1,4 = 1169 \text{ л}$$

Таблиця 3.1.

Розрахунок потужності виробництва анатоксин-вакцини проти стафілококу для забезпечення людей, які знаходяться в зоні ризику

Кількість людей, яку будемо забезпечувати	208 664
Кількість вакцини, яку потрібно прийняти за курс	5,2 мл
Кількість вакцини для забезпечення потреб споживачів	1085 л
Кількість анатоксину на 1 мл вакцини	1 мг
Кількість анатоксину, яка потрібна	1,085 кг
Концентрація анатоксину в культуральній рідині	1,3 г/л
Кількість втрат при очистці анатоксину	40 %
Кількість культуральної рідини на рік	1169 л

3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Приймаємо, що для отримання 1169 л культуральної рідини необхідно 220 робочих трудоднів ($T_{рд}$). Відповідно кількість культуральної рідини на добу ($V_{д}$) становитиме:

$$V_{д} = V_{кр}/T_{рд} = 1169/220 \approx 5,3$$

Розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ($V_{крц}$):

$$V_{крц} = K_1 \cdot V_{д} \cdot T_{цф} / 24 = 1,1 \cdot 5,3 \cdot 22 / 24 \approx 5,35 \text{ м}^3,$$

де $T_{цф}$ - цикл роботи ферментера, який включає: мийку та огляд – 2 год, перевірку на герметичність – 1 год, підігрів та стерилізацію апарату – 2 год, охолодження ферментеру – 1 год, завантаження поживного середовища – 2 год, засів культурою – 1 год, ферментацію – 12 год, та вивантаження – 1 год, і становить 22 години. K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1$).

Геометричний об'єм ферментера для отримання 5,35 л культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення 0,6 (ферментер з аерацією) має становити:

$$V_{г} = V_{цк}/K_{зап} = 5,35/0,6 \approx 8,92 \text{ л},$$

де $K_{зап}$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

Отже, вибираємо стандартний ферментер об'ємом $V_{ф} = 10$ л

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зф} = V_{цк}/V_{ф} = 5,35/10 = 0,535$$

3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{кр} = 5,35$ л культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом з врахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%) становитиме:

$$V_{роб.1} = V_{кр}/(1-E_{ф}) = 5,35/(1-0,1) = 5,94 \text{ л},$$

де $E_{ф}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 5,94$ л.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{\text{ф.1}} = 5,94/0,6 = 9,9$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 10$ та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = V_{\text{роб.1}}/V_{\text{сф}} = 5,94/10 = 0,594$$

Уточнений коефіцієнт дозволяється для ферментерів з аерацією.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}}/(1+X_{\text{ф}}) = 5,94/(1+0,1) \approx 5,4 \text{ л}$$

де $X_{\text{ф}}$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 5,94 - 5,4 = 0,54 \text{ л}$$

540 мл посівного матеріалу ми можемо отримати використовуючи колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм4}}/(V_{\text{колб}} \times K_{\text{зап}}) = 540/(750 \times 0,2) = 4 \text{ шт.}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 4 колб. Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого культивування у ферментері об'ємом 10 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити в 1 етап.

РОЗДІЛ 4

БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму глюкози в *Staphylococcus aureus*

Ростовим субстратом для біосинтезу біомаси *S. aureus* SA564-*acnA::ermB* є глюкоза [2].

У Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes представлена інформація стосовно штамів *S. aureus* USA300_TCH1516 (CF-MRSA) та *S. aureus* USA300_FPR3757 (CA-MRSA). Будемо розглядати перший [31]. Катаболізм глюкози відбувається шляхом гліколізу. Спочатку глюкоза активується фосфорилуванням, перетворюючись на глюкозо-6-фосфат, який ізомеризується до фруктозо-6-фосфату. Фруктозо-6-фосфат піддається фосфорилуванню і перетворюється на фруктозо-1,6-дифосфат, який перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат, який перебуває в рівновазі з діоксиацетонфосфатом. Далі утворюється 1,3-дифосфогліцерат, потім 3-фосфогліцерат і 2-фосфогліцерат, фосфоенолпіруват і піруват.

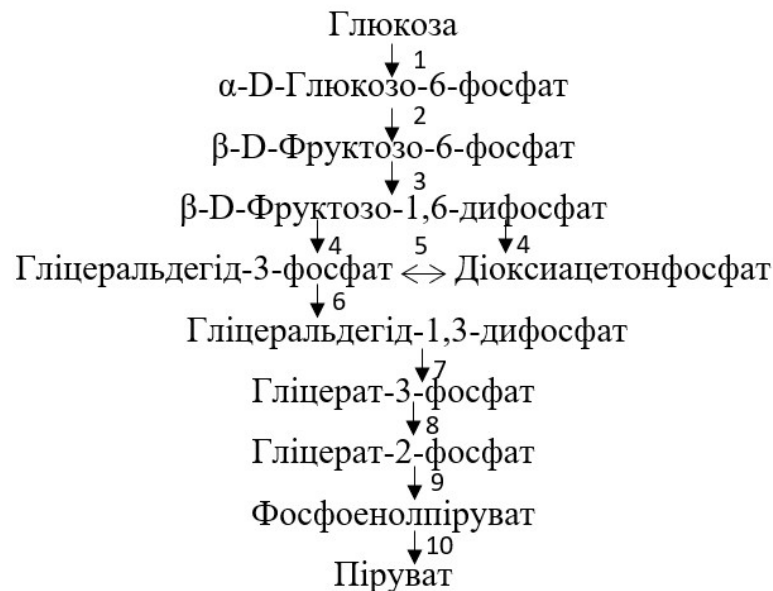


Рис.4.1. Схема катаболізму глюкози до пірувату в *S. aureus*

					НУХТ БТЕК 04.01.42 КР ПЗ			
		№ докум.	Підпис					
Розроб.	Шубіна К.Р.				РОЗДІЛ 4 БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Пенчук Ю.М.						39	97
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Ферменти: 1- глюкоза PTS система ЕПСВА або компонент ЕПСВ (КФ 2.7.1.199); 2 – глюкозо-6-фосфат-ізомераза (КФ 5.3.1.9); 3 – 6-фосфофруктокіназа (КФ 2.7.1.11); 4 – фруктозо-біфосфат-альдолаза (КФ 4.1.2.13); 5- триозофосфатізомераза (КФ 5.3.1.1); 6- гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 7 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 8 – 2,3-біфосфогліцерат-залежна фосфогліцератмутаза (КФ 5.4.2.11); 9 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 10 – піруваткіназа (КФ 2.7.1.43).

4.2. Біотрансформація глюкози у біомасу *Staphylococcus aureus*

Для одержання біомаси *S. aureus* потрібні такі компоненти: ліпіди, пептидоглікан, білки та нуклеїнові кислоти.

Піруват, який утворився в кінці катаболізму перетворюється на ацетил-КоА і вступає в цикл трикарбонових кислот. Анаплеротичними реакціями при рості на вуглеводневому субстраті є карбокислювання фосфоенолпірувату та пірувату.

Ліпіди: так як *S. aureus* є прокаріотом, тому ліпіди представляють собою фосфоліпіди, гліколіпіди та жирні кислоти. Фосфоліпіди і гліколіпіди синтезуються у ряді реакцій із діоксиацетонфосфату, який перетворюється на попередника ліпідів – 3-фосфогліцерин - за допомогою ацил-АПБ. Жирні кислоти утворюються з Ацетил-КоА.

Так як *S. aureus* є грампозитивною бактерією, то синтезуватись буде пептидоглікан без ліпополісахаридів. Пептидоглікан синтезується з глюкозамін-6-фосфату, який утворюється з фруктозо-6-фосфату.

Білки складаються з амінокислот 4-ох родин. Так як *S. aureus* є бактерією, лізин утворюється діамінопімеліновим шляхом.

Нуклеїнові кислоти складаються з нуклеотидів. Піримідинові нуклеотиди синтезуються з карбомойлфосфату і аспартату. Пуринові нуклеотиди – з 5-фосфорибозил-1-пірофосфату [32].

Нижче ферменти не наведено, так як ферменти гліколізу вже описані вище.

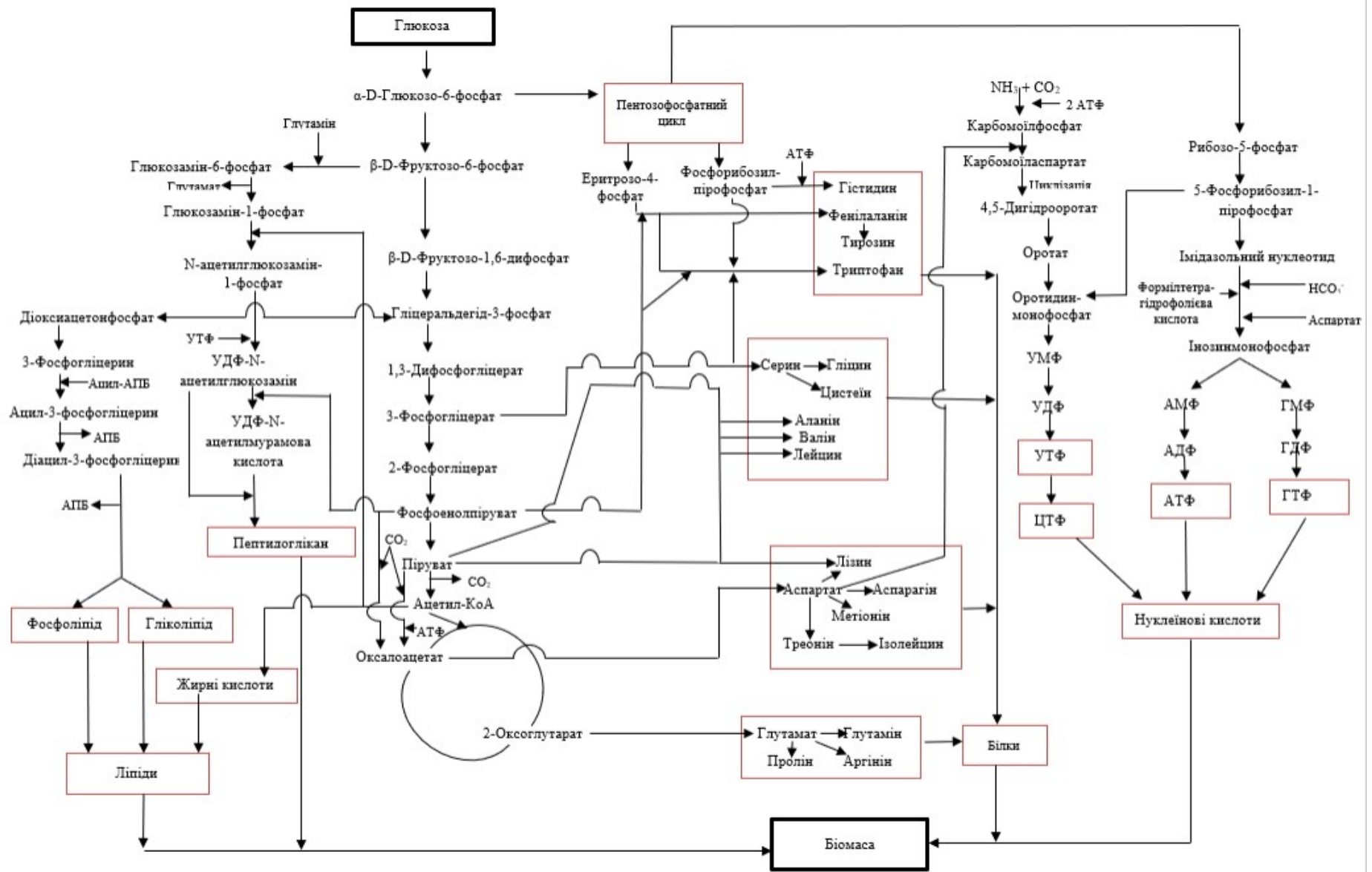


Рис.4.2. Схема біотрансформації глюкози в біомасу *S. aureus*

РОЗДІЛ 5

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Після вибору найкращого біологічного агента слід визначити оптимальні умови культивування продуцента для отримання необхідної кількості цільового продукту. Особливості проведення процесу біосинтезу напряду впливають на вибір технологічного обладнання для його реалізації.

Мутантний штам *Staphylococcus aureus* SA564-acsA::ermB є аеробом, мезофілом, оскільки його культивування проводили за температури 37 °С. Також оптимальним значенням для культивування штаму SA564-acsA::ermB є рН 6. У зв'язку з цим, виникає ризик контамінації середовища для вирощування сторонньою мікрофлорою, яка здатна зростати за аналогічних умов. Тому слід забезпечити асептичні умови культивування продуцента стафілококового токсину. Як правило, умови асептики важко забезпечити при твердофазному способі культивування, тому обираємо глибинний метод вирощування культури, забезпечення асептичних умов при цьому буде здійснюватись шляхом стерилізації повітря для аерації, технологічного обладнання, комунікацій, поживного середовища для культивування *S. aureus* SA564-acsA::ermB.

Для запобігання потрапляння контамінантів до поживного середовища необхідно забезпечити створення надлишкового тиску подачею стерильного аераційного повітря.

Як було вказано у роботі [2], найвищу концентрацію δ -токсину спостерігали в експоненційній фазі росту культури – на 12 годину вирощування. З огляду на економічність та оптимальність проведення вирощування, це буде складно забезпечити при безперервному процесі культивування. Тому обираємо

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.42 КР ПЗ</i>			
		№ докум.	Підпис					
Розроб.	Шубіна К.Р.				РОЗДІЛ 5 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Пенчук Ю.М.						42	97
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

періодичний спосіб культивування .

Отже, процес культивування *S. aureus* SA564-*acnA::ermB* для отримання стафілококового анатоксину буде відбуватись у періодичному режимі глибинним способом із забезпеченням умов аерації та асептики.

Після визначення оптимальних параметрів ведення процесу культивування продуцента стафілококового токсину варто визначити та підібрати необхідне технологічне обладнання, зокрема і ферментер для проведення біосинтезу.

Як вже було згадано, культивування токсину відбувається в кисневих умовах, тому ферментер для вирощування *S. aureus* SA564-*acnA::ermB* має бути обладнано барботером для подачі стерильного аераційного повітря в апарат. Контролювати рівень розчиненого кисню у середовищі можна спеціальним датчиком, який теж слід установити на ферментер.

Так як кисень нелегко розчиняється у поживному середовищі, ферментер також має бути оснащено перемішуючим пристроєм, який має працювати в режимі 225 об/хв [2]. Такий режим роботи може забезпечити турбінна мішалка [8], що забезпечує інтенсивну циркуляцію середовища по всьому об'єму апарата. Завдяки особливостям роботи даної мішалки збільшується розчинення газоподібних речовин (зокрема кисню) у рідкій фазі.

Оптимальна температура для культивування *S. aureus* SA564-*acnA::ermB* потребує постійної підтримки та контролю, тому необхідно оснастити ферментер відповідним датчиком контролю температури. Регуляцію температури здійснюють через сорочку ферментера, тому її наявність на апараті теж варто забезпечити.

Так як оптимальним значенням для *S. aureus* SA564-*acnA::ermB* є рН 6, ферментер має бути обладнано відповідним датчиком контролю рН.

Для зазначених потреб підійде ферментер BLBIO-10SJ. Конструкція ферментера відповідає вимогам GMP EU. Обладнаний барботером, манометром, технологічними штуцерами, датчиком рН, температури, пробовідбірником типу КЕОФІТ. У ферментері є турбінна 3-х ярусна мішалка, режим роботи регульований у діапазоні 200-400 об/хв. На стійці вмонтовано пульт управління апаратом [33].



Рис.5.1. Ферментер BLBIO-10SJ в системі BLBIO-10SJ-100SJ [33]

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Оскільки продуцент анатоксину – *Staphylococcus aureus* SA564-acnA::ermB є аеробною бактерією, то постає необхідність під час процесу біосинтезу у безперервній подачі стерильного повітря через барботер.

Підготовка стерильного аераційного повітря проходить таким чином:

1. Забір атмосферного повітря за допомогою турбокомпресора через забірну шахту, на висоті 2-3 м від найвищої точки будівлі, тобто на висоті ~ 10 м (висота поверху – 6 м, кількість поверхів – 1, косий дах будівлі (~1,5 м)).
2. Аби істотно знизити кількість контамінуючих організмів, повітря далі пропускають у фільтри попереднього очищення, в яких його звільняють від грубого аерозолі – пилу.
3. Стиснення повітря у турбокомпресорі до 0,35 – 0,5 МПа, що призводить до підвищення його температури (120 – 250 °С) і збільшення вмісту вологи на одиницю об'єму.
4. Аби не призводити до злипання волокон і утворення каналів, забезпечується випадання вологи у краплєвловлювачі охолодженням повітря за допомогою теплообмінного апарату.
5. Видалення конденсованої вологи у ресивері, що потрапила із компресора.

6. Підігрів повітря у теплообмінниках.

7. Очищення повітря на головних фільтрах.

8. Очистка повітря на індивідуальних фільтрах. Від головних фільтрів повітря проходить колектором в індивідуальні фільтри третього рівня, що встановлені безпосередньо на кожному ферментері (затримують 99,999% мікроорганізмів).

Конструкція індивідуального фільтра залежить від типу фільтрувального матеріалу, що застосовується. У процесі експлуатації фільтрів необхідна також їхня стерилізація. Найефективніший спосіб – нагрівання вологою парою і витримування впродовж певного часу за температури 125 – 130 °С [34].

У мікробіологічних боксах та лабораторіях, де здійснюється підготовка посівної культури для вирощування інокуляту у колбах на качалках, повітря стерилізують шляхом опромінення ультрафіолетовими променями (використання УФ-ламп).

5.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Замислюватися про дезінфекцію люди почали ще в 19 столітті. Першим, кому спало на думку як боротися з мікробами та іншими «шкідливими» організмами і речовинами, став доктор І. Земмельвейс, Відень. Починаючи огляд пацієнта, Земмельвейс мив руки розведеною хлоркою, а по закінченню - протирав їх вапном з тієї ж хлорки [35].

Після цього, вже в Англії, доктор Д. Лістер знову вдався до дезінфекції в боротьбі за чистоту. Він обробляв руки і інструментарій карбоновою кислотою. Незабаром, після недовгих спостережень за результатом, дезінфікуючі засоби стали набирати обертів [35].

На сьогоднішній день, дезінфікуючі засоби можна помітити в кожному медичному закладі, а також в салонах краси, масажних салонах, стоматологічних кабінетах, дитячих садах, кафе, ресторанах і там, де має бути присутня стерильність і чистота [35].

Дезінфікуючі засоби - це засоби, хімічного або фізичного походження, які націлені на повне знищення хвороботворних вірусів і мікробів на тілі людини, інструментах і поверхнях [35].

Робота з дезінфікуючими засобами вимагає особливої уважності, адже такі засоби є хімікатом, нехай навіть і без очевидної шкоди для людини. Використання дезінфікуючих засобів передбачає усунення всіх мікробів, вони перешкоджають розмноженню вірусів та інфекцій, усувають бактерії, повністю знезаражують будь-який об'єкт в досить короткий проміжок часу, у них повний антимікробну дію [35].

Засоби для дезінфекції поверхонь борються з поширенням різних видів інфекцій, крім цього, вони діють профілактичним властивістю. Такі дезінфікуючі засоби мають миючі містять в своєму складі, це дає можливість не просто дезінфікувати поверхню, а й мити її. Засоби для дезінфекції поверхонь найчастіше продаються в готовому і концентрованому варіанті. Перший з них не потрібно розбавляти, що зручно при малому наявності часу, зручно в застосуванні. Використовуючи готовий засіб дезінфекції, можна не хвилюватися про неправильну концентрації розведення. Концентровані засоби для дезінфекції поверхонь економічні в своєму витраті. Тут можна самому регулювати ступінь концентрації в робочому розчині [35].

Хімічні методи дезінфекції широко застосовують на практиці. В основі їх лежить використання різних хімічних речовин, які вбивають мікроорганізми. Хімічні речовини чинять різну дію на мікроорганізми [36]:

- бактерицидну — здатність вбивати бактерії;
- бактеріостатичну — пригнічують їх життєдіяльність;
- віруліцидну — здатність вбивати віруси;
- фунгіцидну — здатність вбивати грибки;

Серед хімічних дезінфекційних засобів розрізняють засоби м'якої дезінфекції, що використовують для антисептичної обробки шкіри рук, одягу, білизни і засоби сильної дезінфекції, які використовують для знезараження дуже забруднених матеріалів [36].

До хімічних дезінфікуючих засобів належать [36]:

- хлор і його сполуки (р-ни хлорного вапна, хлорамін та ін.)
- галогени (спиртйод, йодонат, розчин Люголя та ін.)
- окисники (перекис водню, перманганат калію та ін.)
- феноли (фенол, лізол)
- спирти (етиловий, метиловий)
- альдегіди(формалін, формальдегід)
- кислоти, луги, барвники, солі важких металів та інші.

Дезінфекційні засоби в Україні підлягають гігієнічній регламентації та державній реєстрації в порядку, встановленому законодавством. Виробництво, зберігання, транспортування, застосування та реалізація дезінфекційних засобів здійснюються з дотриманням вимог відповідних нормативно-правових актів. Застосування дезінфекційних засобів, не зареєстрованих у встановленому порядку в Україні, а також тих, у процесі виготовлення, транспортування чи зберігання яких було порушено вимоги технологічних регламентів та інших нормативно-правових актів, забороняється. Теоретичну і методологічну основу для створення вискоєфективних в цільовому відношенні і безпечних для людей і довкілля дезінфекційних засобів та розробки оптимальних технологій їх застосування забезпечує наука дезінфектологія [36].

Працівники, котрі працюють із дезінфекційними хімічними засобами, зобов'язані [37]:

- виконувати правила внутрішнього трудового розпорядку;
- знати властивості дезінфекційних засобів та їх дію на організм людини;
- вміти користуватися засобами індивідуального та колективного захисту;
- пройти інструктаж відповідно до інструкції з надання долікарської допомоги та мати навички надання такої допомоги потерпілому залежно від отриманої травми, отруєння тощо;

- пройти інструктаж із пожежної безпеки, знати, де розташовані первинні засоби пожежогасіння, вміти ними користуватися;
- дотримувати правил особистої гігієни, їсти у передбачених для цього місцях, утримувати в порядку робоче місце.

Вимоги до властивостей засобу для дезінфекції [38]:

– засіб повинен забезпечувати знищення вірусів, бактерій і грибів, а за необхідності й інші цільові інфекційні збудники.

– засіб не повинен пошкоджувати матеріали;

– важливою є наявність у складі обраного засобу

комплексоутворювачів, які нейтралізують солі жорсткості у воді, яка була використана для приготування робочого розчину, і підвищують ефективність антимікробної дії засобів, а також поверхнево-активних речовин, які знижують поверхневий натяг розчинів, підвищують їхні змочувальні властивості, підтримують емульгуючу та диспергуючу дію, перешкоджають повторному відкладенню забруднень з розчину на поверхню інструментів. Правильно підібрані поверхнево-активні речовини в засобах для машинного застосування здатні знижувати піноутворення розчинів;

– коротка експозиція дезінфекції у визначеному режимі для зменшення потенційного негативного впливу розчинів і підвищення продуктивності праці персоналу;

– відсутність у складі засобу летких компонентів з подразнюючою дією на слізіві оболонки очей і органів дихання людини;

– засіб має легко змиватись водою не залишаючи на поверхнях інструментів нальоту чи плівки.

Хлоровмісні дезінфікуючі засоби, більш відомі нам як «хлорка», потрібно використовувати для щоденного вологого прибирання, обробки великих поверхонь. Вологе прибирання варто проводити в захисних рукавичках і (за можливості) у спеціальному одязі для прибирання. Водночас слід не забувати

добре вентилювати оброблені дезінфекторами приміщення. Найпоширенішими та найбільш дешевими дезінфекційними засобами, що використовують на виробництві, є хлорне вапно та «вапняне молоко» [39].

Хлорне вапно — сухий білий порошок із різким запахом хлору, токсично впливає на організм людини. Порошок хлорного вапна і хлор, що виділяється під час розкладання хлорного вапна, подразнюють дихальні шляхи та очі, пошкоджують зуби, можуть спричинити бронхіальну астму, подразнюють шкіру (що може призвести до її атрофії). «Вапняне молоко» утворюється під час змішування гашеного вапна (кальцію гідроксиду) із водою (кальцій гідроксид є лугом) [39].

Деякі дезінфекційні засоби потребують певного розведення водою, тому необхідно уважно дотримуватися інструкції. Надто низька концентрація діючої речовини у деззасобі може знизити ефективність дезінфекційних заходів [39].

Вологе прибирання з використанням дезінфекційних засобів варто проводити в гумових рукавичках, що дозволить захистити руки від дії агресивних хімічних речовин, та в спеціальному одязі, фартушку, що захистить одяг від пошкодження [39]. Порівняння дезінфекційних засобів наведено в табл.5.1.

Оскільки виробництво працює весь рік, варто передбачити 3 типи різних засобів, для попередження утворення стійкої резистентності до препаратів. Тому, в таблиці 5.1. наведено порівняння 3 типів дезінфекторів – альдегідних, хлорвмістних та ЧАС (комплекс чотирьох амонієвих сполук).

Потрібно зазначити. Що препарати підбрано таким чином, щоб в складі були відсутні ті чи інші сполуки, які відносяться до інших розглянутих груп. Комбіновані препарати є дуже популярними на ринку, проте у даній ситуації вони відіграють негативну роль, оскільки можуть призвести до стійкої резистентності.

Порівняння пропонується вести за ціною робочого розчину, оскільки вартість концентрату не завжди показує його вигідність поміж інших препаратів. Тоді, за препаратом альдегідної групи найвигіднішим дезінфектором є БАЦИЛІКВІД ЛОНГ. Всього 54 копійки коштує 1 л робочого розчину.

Порівняння різних дезінфікуючих засобів

Тип	Назва препарату	Ціна за 1 л, грн	Робочий розчин, %	Ціна робочого розчину, грн	Джерело
Альдегіди	Формалін 37%	148,7	1	1,49	[40]
	Лізоформін 3000	625	0,25	1,56	[41]
	БАЦИЛКВІД ЛОНГ	540	0,1	0,54	[42]
Хлор	Бланідас 300	330	0,01	0,03	[43]
	Амінорм	305	0,05	0,15	[44]
	Гуасепт	310	0,3	0,93	[45]
ЧАС	ДЕЗЕКОН ОМ	450	0,02	0,09	[46]
	Чистолайн Універсал	135	0,5	0,68	[47]
	Полідез	210	0,05	0,11	[48]

Примітка: ціни наведено станом на квітень 2023 року

Щодо хлорвмістних препаратів, найдешевшим за робочим розчином є Бланідас 300. Вартість його розчину становить всього 3 копійки. Потрібно зазначити, що це єдиний препарат, серед вказаних, який продається у формі таблеток, що є набагато зручнішим, ніж концентрований розчин чи порошок. Стосовно ЧАС, найвигіднішим препаратом є ДЕЗЕКОН ОМ. Вартість 1 л робочого розчину дезінфектору становить всього 9 копійок.

Отже, було обрано БАЦИЛКВІД ЛОНГ, Бланідас 300 та ДЕЗЕКОН ОМ.

Миючі засоби (детергенти) – це група засобів побутової хімії, призначених для очищення різних поверхонь і матеріалів від всякого роду забруднень. Вони мають спеціальні властивості, можуть відрізнятися ефективністю, бути спрямованими на боротьбу з тим чи іншим видом бруду, а також універсальними (допомагають упоратися з різними забрудненнями). Їх використання можливе як вручну, так і з залученням обладнання, як в побуті, так і на різного спрямування підприємствах. Найбільшого поширення набули три форми детергентів: мило, пральний порошок і рідкі суспензії. Це не тільки звичні для кожного з нас шампуні, гелі, порошки, але й матеріали для чищення дорожніх покриттів, елементів техніки, поверхонь. Одні з них добре справляються з харчовими забрудненнями, інші – з маслянистими, ще інші – з кіптявою, сажею та іншими непростими завданнями. Виготовляють миючі засоби на спеціалізованих хімічних заводах. В основі виробництва лежать ретельні наукові розробки. А для роботи використовується технологічне обладнання, що дозволяє створювати продукцію в значних обсягах, синтезуючи складники [49].

Якщо брати за основу склад, то миючі засоби бувають [49]:

- милами. Їх складають солі Na і K плюс жирні або нафтеніві кислоти. Створення таких засобів виглядає як омилення каустиком при нагріванні в казанах рослинних і тваринних жирів та олій. Солі натрію при цьому дають можливість отримати тверде натрієве мило, калію – рідке калійне, нафтенівих кислот – нафтенове. У мило, як правило, додатково вносять пігменти, ефірні олії, есенції та інші речовини для додання естетичного зовнішнього вигляду і приємних ароматичних характеристик. Серед позитивних якостей цього виду: гарне

змочування, емульгування, допомога в механічному очищенні, певна бактерицидна дія, яка посилюється при підвищенні температури розчину для миття.

- лужними. Самі по собі добре справляються лише з легкими плямами, оскільки їх вплив на оброблювані поверхні не надто сильний. Однак якщо доповнити їх спеціальними добавками, цілком допоможуть видалити і складні плями. В цілому, підходять для обробки різних матеріалів. Основна сировина – сода (каустична, кальцинована або кристалічна). Перша добре піддає гідролізу білки, приводить до розщеплення вуглеводів і чудово дає раду з мікробами на вегетативній стадії, однак може спровокувати корозію металевих елементів. Друга (сода кальцинована) – дещо слабший луг у вигляді дрібнокристалічного порошку, легко розчинного у воді. Її гарячі розчини добре зарекомендували себе в омиленні жирів і гідролізі білків. При поєднанні з твердою водою утворюється твердий осад вуглекислого кальцію і низки інших солей, які не підлягають розчиненню. Вона – активний учасник виготовлення мила, створення порошоків для миття, засобів для очищення посуду. У ній замочують білизну, яйця та ін. Що стосується третього виду соди (розчинів на її основі), то в ньому міститься 63 % води. Найчастіше використовується для замочування і очищення посуду. Засоби лужної природи можуть також бути виготовлені з таких речовин, як тринатрійфосфат і силікат натрію. Тринатрійфосфату властивий значний вплив як емульгатора і пептизатора, а також пом'якшення водного середовища. Він підходить для миття посуду, інвентарю та техніки. Водні розчини силікату миють, знезаражують і дезінфікують. Ця сполука – активний компонент миючих сумішей, рН яких перебуває в діапазоні 11,9-12,9. Однак при її використанні варто враховувати, що фарби і гумові вироби можуть втратити колір, а на склі з'являться плями, які потім не змити.

- кислотними. Такі композиції (суміші з азотною та сульфаміною кислотами) активно поєднуються зі солями молока, тому найчастіше використовуються при очищенні різних агрегатів на молокозаводах. Їх слабкі розчини застосовують для дезінфекції-профілактики в харчопромі. При використанні кислотних МЗ важливо враховувати можливість псування оброблюваних поверхонь.

- синтетичними (СМЗ). Головна маса всіх миючих засобів з великою кількістю переваг. Це багатокомпонентні композиції, які складаються, в основному, з ПАР або сумішей ПАР (катионо- і аніоноактивних, іоно- та неіоногенних тощо), а також з різноманітних хімічних добавок (ензимів, пом'якшувачів води, компонентів для дезінфекції, відбілювання, освіжувачів фарб, ароматизаторів, інгібіторів корозії, фарбувальних речовин і тих, що покращують піноутворення), завдання яких – надання особливих властивостей. Очищення за допомогою СМЗ ефективно і в м'якій, і в твердій воді. Вони не реагують з Са і Mg, тому не формують нерозчинних компонентів. Можуть бути порошко- і пастоподібними, рідкими і гранульованими. Варто відзначити, що чим вищі очищувальна здатність і біологічне розкладання ПАР, які входять до їх складу, тим кращим вважається засіб. Маючи справу зі синтетичними засобами, не варто забувати про можливий негативний вплив на організм і навколишнє середовище: знежирення шкірних покривів, зміна фізіологічних, біохімічних та біофізичних процесів у шкірі, прояв дерматитів і алергій органів дихання. Потрапляння СМЗ у водойми разом зі стоками може порушити природне самоочищення.

- дезінфікуючими. Ця група засобів складається, як правило, з хім. компонентів призначених для видалення бактерій. З їх допомогою виконують санобробку харчових, медичних і побутових об'єктів, враховуючи, при цьому, чи є вони універсальними, чи підходять для очищення тільки підлоги, поверхонь, що не всмоктують вологу та ін. Це зазвичай багатокомпонентні суміші, оскільки різні хімічні речовини можуть доповнювати вплив одна одної, чого не скажеш про застосування їх окремо. А спектр композицій набагато ширший, ніж окремих сполук. До їх складу можуть входити хлорамін, щавлева кислота, калієва сіль ДХЦК, метасилікат натрію, гіпохлорит кальцію та інші речовини. Щоб посилити бактерицидний ефект, у дезінфектанти додають мило, яке допомагає в розчиненні жирів, прибирає бруд разом з мікробами, знижує поверхневий натяг, завдяки чому засіб краще проникає в клітини мікроорганізмів. З медичною та гігієнічною метою в такі засоби можуть бути внесені ліки або хім. дезінфікуючі компоненти (наприклад, фенол, дьоготь або ін.).

Миючі засоби повинні бути [50]:

- нешкідливими для здоров'я людини і не надавати токсичну, алергічне і шкірно-резорбтивна дія, а компоненти, що входять до складу миючих засобів не чинити на організм мутагенну, тератогенну, канцерогенну, ембріотоксичну дію;
- добре розчинятися у воді;
- володіти високими миючими властивостями
- легко і швидко змиватися з посуду, інвентарю тощо;
- біологічно руйнуватися у воді (більше 80%), тому що вони негативно впливають на процеси природного самоочищення і водні організми.

Миючі засоби не повинні [50]:

- кумулюватися (накопичуватися) в організмі людини;
- мати різкий і стійкий запах;
- впливати на якість продуктів;
- надавати шкідливої дії на миються об'єкти.

Порівняння миючих засобів показано в табл.5.2.

Лужні засоби обираються як основні миючі, а кислотні – через можливість видалення більших забруднень, у тому числі – вапняного нальоту, який може утворюватися через водопровідну воду.

Для вибору відповідного засобу пропонується притримуватись того ж самого принципу, що й з дезінфекторами, але беручи до уваги піноутворення засобу. Цей критерій є дуже важливим, оскільки піна сповільнює час обробки апарату, оскільки з'являється новий параметр контролю, а саме час її осадження. Щодо лужних засобів, найвигіднішим є безпінний препарат SUPRA. За 1 л розчину потрібно заплатити всього 2 копійки. А з кислотними препаратами складніше. Безпінний засіб ANTIKALKEN FS1/f3 є найдорожчим серед усіх зазначених. Тому, пропонується обрати засіб GOOD RESULT, який за 1 л робочого розчину коштує всього 52 копійки, а також він є малопінним.

Отже, як лужний засіб було обрано SUPRA, а як кислотний - GOOD RESULT.

Порівняння різних миючих засобів

Тип	Назва препарату	Ціна за 1 л, грн	Робочий розчин, %	Ціна робочого розчину, грн	Піноутворення	Джерело
Лужні	Nerta BC-50	120	0,5	0,6	Активне	[51]
	ПРОФІ 212	58,5	0,5	0,3	Мінімальне	[52]
	SUPRA	155	0,01	0,02	Відсутнє	[53]
Кислотні	GOOD RESULT	110	0,5	0,55	Мінімальне	[54]
	Ekfil Foam A	75	2	1,5	Активне	[55]
	ANTI-KALKEN FS1/f3	118,44	5	5,92	Відсутнє	[56]

Примітка: ціни наведено станом на квітень 2023 року

Виробництво вакцини триває впродовж 250 днів. Під час виробництва використовується деякі одиниці апартури, яку потрібно мити. Обладнання та її габарити показано в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Габарити обладнання для виробництва вакцини

Обладнання	Геометричний об'єм, л	Діаметр, мм
Реактор для композиції Б	5	410
Реактор для композиції В	5	410
Ферментер	10	890
Всього	20	

Виробництво включає наступні приміщення: цех виробничого біосинтезу, лабораторне приміщення для проведення різноманітних операцій, де знаходяться автоклави, бокс, термостати, холодильники, апаратура для проведення різних видів контролю.

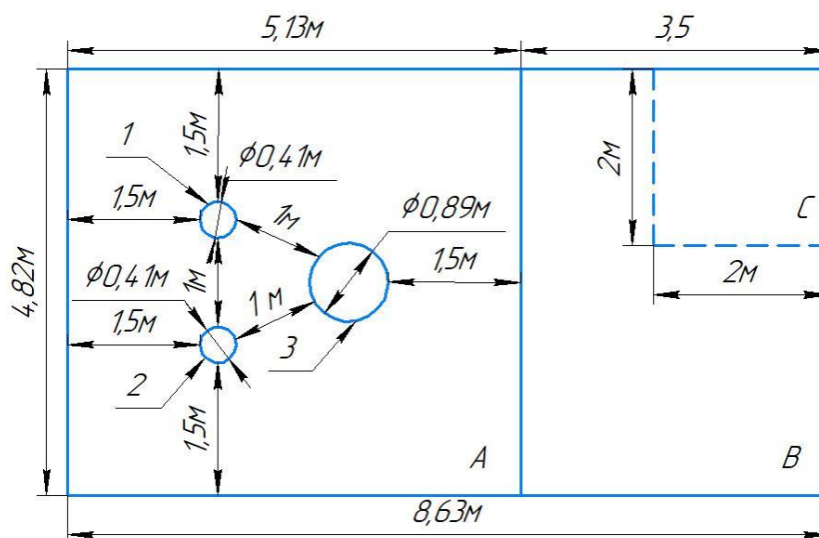


Рис. 5.2. План виробничого приміщення для виробництва анатоксину

А – цех виробничого культивування: 1,2 – реактор на 5 л, 10 - ферментер об'ємом 10 л; В – лабораторія; С – бокс.

На рис. 2.1 наведено приблизний план приміщення для аскорбату. План враховує діаметри обладнання та відстань між апаратами (не менше 1 м) і від стін (не менше 1,5 м).

Площа цеху виробничого культивування (А) становить $4,82 \times 5,13 = 24,73 \text{ м}^2$. Площа лабораторії (Б) становить $3,5 \times 4,82 = 16,87 \text{ м}^2$. Таким чином, загальна площа виробничого приміщення становить $24,73 + 16,87 = 41,6 \text{ м}^2$.

Необхідно провести розрахунок площі стін для миття. З урахуванням висоти стін, яку необхідно помити (2,5 м), загальна площа стін для миття становитиме:

$$((4,82 \times 4) + (8,63 \times 2) + (2 \times 4)) \times 2,5 = 87,25 \text{ м}^2$$

Узагальнені дані щодо площі приміщень наведено у табл.5.4.

Таблиця 5.4

Розрахунок загальної площі приміщень для виробництва вакцини

Приміщення	Обладнання	Площа приміщення, м ²	Площа стін, м ²
Цех виробничого біосинтезу (А)	Ферментер об'ємом 10 л, та 2 реактори на 5 л	24,73	49,75
Лабораторія (Б)	Автоклави, бокс (В), термостати, холодильники, апаратура для проведення контролю, хімічний посуд, та інше.	16,87	37,5
Всього		41,6	87,25

Далі, на основі наведених вище даних, необхідно провести розрахунок кількості мийних та дезінфікувальних засобів для миття приміщень та обладнання.

Таблиця 5.5

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (м ³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) оброблюваного об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнання	0,02	273	5,46
Підлога	41,6	250	10 400
Стіни, двері, вікна	87,25	9	785,25

Обладнання необхідно мити та дезінфікувати перед кожним виробничим циклом, тобто 273 раз на рік (кількість циклів на рік).

Підлогу необхідно мити та дезінфікувати кожного дня по одному разові – всього 250 разів (відповідно до кількості трудоднів).

Стіни, двері та вікна миють та дезінфікують раз на місяць в якості генеральних прибирань. Кількість генеральних прибирань становитиме 9 разів.

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та/або дезінфекції наведено в табл.5.5.

5.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Виробничий біосинтез токсину *S. aureus* SA564-*acnA::ermB* здійснюють у ферментері об'ємом 100 л з коефіцієнтом заповнення 0,6. Інокулянт отримують у колбах на качалках, а виробничий біосинтез відбувається в ферментері об'ємом 10 л.

Поживне середовище має наступний склад (г/л):

- ✓ Глюкоза – 2,5;
- ✓ Триптон – 17,0;
- ✓ Соевий пептон – 3,0;
- ✓ NaCl – 5,0;
- ✓ K₂HPO₄ – 2,5;
- ✓ Глутамат – 9.

Триптон та соєвий пептон слід об'єднати в одну композицію, зважаючи на відмінний від глюкози режим стерилізації. Значення рН потребує підтримання на зазначеному рівні (рН 6), тому треба передбачити підготовку титрувальних агентів – 6%-х розчинів соляної кислоти та натрію гідроксиду.

Стерилізацію поживного середовища для отримання посівного матеріалу в колбах на качалках здійснюють в автоклаві, зважаючи на незначні об'єми (0,6 л). Композицію солей середовища для виробничого біосинтезу стерилізують безпосередньо в апараті, композиції, що містять глюкозу та триптон з соєвим пептоном готують та стерилізують в окремих збірниках.

Для подальшого визначення способу приготування композицій поживного середовища та відповідним обладнанням (колби, реактори), далі треба розрахувати

**Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких
компонентів поживного середовища**

Об'єм середовища, л	Глюкоза		Триптон і соєвий пептон		HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Вміст, г	Особливість приготування	Вміст, г	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,6	1,5	У колбі на 250 мл	12	У колбі на 500 мл	-	-	-	-
6	15	У колбі на 2 л	120	У реакторі на 5 л	12	У колбі на 250 мл	12	У колбі на 250 мл

відповідні кількості компонентів для приготування середовища на кожен технологічну стадію біосинтезу токсину (табл.5.6).

Інформація, наведена у табл.5.6, засвідчує, що глюкозу для виробничого біосинтезу готують та стерилізують у колбі 2 л, у той час як для приготування та стерилізації композиції, що складається з триптон та соєвого пептону, для здійснення виробничого біосинтезу необхідним є реактор 5 л. Титрувальні агенти готують в колбах, зважаючи на їх невеликі об'єми.

З огляду на склад та особливості стерилізації поживного середовища для вирощування *S. aureus* SA564-*acnA::ermB*, умовно ділимо його на такі композиції:

Композиція А: глюкоза (30 хв, 112 °С).

Композиція Б: триптон, соєвий пептон (30 хв, 120 °С).

Композиція В: NaCl, K₂HPO₄, глутамат натрію (40 хв, 131 °С).

Глюкоза, що становить композицію А, є вуглеводом, тому вона стерилізується за найнижчої температури, у той час як температура стерилізації пептонних складових композиції Б є дещо вищою. Сольові компоненти композиції В стерилізуються за відповідного жорсткого режиму. Всі композиції на даному етапі стерилізують в автоклаві.

Таблиця 5.7

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 600 мл середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 600 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	2,5	1,5	А	100
Вода		100 мл		
Триптон	17	10,2	Б	250
Соєвий пептон	3	1,8		
Вода		250 мл		
NaCl	5	3	В	250
K ₂ HPO ₄	2,5	1,5		
Глутамат натрію	9	5,4		
Вода		250 мл		
Всього				600

Стерилізація 6 л поживного середовища буде проходити у відповідних ємностях, при цьому композиції залишаються незмінними.

Композиція А: глюкоза (30 хв, 112 °С).

Композиція Б: триптон, соєвий пептон (30 хв, 120 °С).

Композиція В: NaCl, K₂HPO₄, глутамат натрію (40 хв, 131 °С).

Глюкоза, що становить композицію А, є вуглеводом, тому вона стерилізується за найнижчої температури, у той час як температура стерилізації пептонних складових композиції Б є дещо вищою. Сольові компоненти композиції В стерилізуються за відповідного жорсткого режиму. Глюкозу на даному етапі стерилізують в автоклаві, композицію Б у відповідному реакторі, а композицію В безпосередньо у ферментері на 10 л.

Таблиця 5.8

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6000 мл середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6000 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глюкоза	2,5	15	А	1000
Вода	1000 мл			
Триптон	17	102	Б	2500
Соєвий пептон	3	18		
Вода	2130 мл			
Конденсат	250 мл		В	2500
NaCl	5	30		
K ₂ HPO ₄	2,5	15		
Глутамат натрію	9	54		
Вода	2150 мл			
Конденсат	250 мл			
Всього				6000

РОЗДІЛ 6
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ
ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Специфікацію обладнання для виробництва вакцини протисфатфілококової зазначено в табл.6.1.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та
виробничого біосинтезу анатоксину

Позиція	Найменування	К-ть	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Повітрозбірник 300 л («Компресормаш-Сервіс»). Температура повітря до 100 °С; тиск до 12 бар [57].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр грубого очищення повітря JCB 3CX. Виробник: «Спецтехніка-Київ». Фільтрувальний матеріал: синтетичне волокно класу G4 [58].
К-3	Компресор	1	Турбокомпресор Т2 (Виробник: «Dalgakiran»). Продуктивність: 2250 м ³ /год; робочий тиск: 5.5 – 8.8 бар; габаритні розміри, мм: 2450x1640x1900 [59].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач DK 130, продуктивність 18,33 м ³ /хв, робочий тиск 7 бар, 948*728*1370 мм, потужність приводу – 1,81 кВт [60].
Р-5	Ресивер	1	Ресивер ПЗВ 500-600-11-01 (Виробник: «Zelko»). Об'єм, л: 500; максимальний тиск: 11 бар; габаритні розміри, мм: 2125x600 [62].
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник (нагрівач повітряний водяний) КВ 2500 (Виробник: «Галактик»). Кількість повітря: 6000 м ³ /год; тепла потужність: 60 кВт; габаритні розміри, мм: 1000x500x200 [63].

				НУХТ БТЕК 04.01.42 КР ПЗ			
		№ докум.	Підпис				
Розроб.	Шубіна К.Р.			РОЗДІЛ 6 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУСХЕМИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Пенчук Ю.М.					62	97
Реценз.					Кафедра БТМ ⁶²		
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						

Закінчення табл.6.1

Ф-7	Головний фільтр очистки	1	Фільтр тонкої очистки класу F9 (Виробник: «SCHNEIDER-ENGINEERING»). Фільтрувальний матеріал: неткане волокно із гранулами активованого вугілля; E>95% [64].
ІФ-8	Індивідуальний фільтр	2	Фільтр у сталевому корпусі BF. Фільтруючий матеріал: боросилікатне волокно; робочий тиск: 16 бар; діапазон температур: 1,5-65 °С; ступінь очищення повітря фільтром: 99,999 % [65].
РЗ-9	Реактор-змішувач для приготування і стерилізації композиції Б	1	Реактор-змішувач А2000 series об'ємом 5 л «Amar Equipments» (Індія). Оснащений сорочкою, турбінною мішалкою: 100-1450 об/хв; макс. температура – 300 °С; габаритні розміри, мм (із контрольною панеллю): 410 x 1100 [66].
РЗ-10	Реактор-змішувач для приготування композиції В	1	Реактор-змішувач А2000 series об'ємом 5 л «Amar Equipments» (Індія). Оснащений сорочкою, турбінною мішалкою: 100-1450 об/хв; макс. температура – 300 °С; габаритні розміри, мм (із контрольною панеллю): 410 x 1100 [66].
Ф-11	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 10 л BLBIO-10SJ (Виробник: «BLBIO»). Матеріал корпуса: нержавіюча сталь AISI 316L; обладнаний турбінною мішалкою: 200 об/хв; з рубашкою; датчиками вимірювання рН, рО ₂ , DO, температури; витратоміром, манометром, барботером, контролером рівня рідини; потужність: 2 кВт; габаритні розміри, мм: 890x660x1600 [33].
Н-12	Насос перистальтичний для перекачування культуральної рідини до збірника на зберігання	1	Перистальтичний насос PTL 09. Продуктивність: до 60 л/год; тиск: до 4 бар; типорозмір: 40 об/хв [67].

РОЗДІЛ 7

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ

Технологічна схема біосинтезу анатоксину *Staphylococcus aureus* SA564-acnA::ermB складається із допоміжних робіт та основного технологічного процесу. До стадій допоміжних робіт (ДР) належать: підготовка виробництва, підготовка стерильного аераційного повітря, приготування титрувальних розчинів HCl та NaOH, приготування, підготовка і стерилізація поживних середовищ. До стадій основного технологічного процесу (ТП) відносять: підготовку посівного матеріалу та виробничий біосинтез.

Технологічну та апаратурну схеми біосинтезу анатоксину наведено у графічній частині кваліфікаційної роботи.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка мийних та дезінфікувальних засобів

ДР 1.1.1 Приготування мийного розчину SUPRA

Для миття обладнання використовують мийний засіб SUPRA. Для забезпечення миття усього обладнання достатньо буде приготувати близько 4 л робочого розчину. Для цього у сталеву ємність на 5 л наливають 0,4 мл мийного засобу SUPRA за допомогою семплера на 1 мл. Після чого, за допомогою мірного циліндру на 5 л вливають 4 л води водопровідної. Перемішують розчин вручну.

ДР 1.1.2 Приготування робочого розчину БАЦИЛІКВІД ЛОНГ

Для щоденного прибирання приміщень необхідна кількість робочого розчину БАЦИЛІКВІД ЛОНГ концентрацією 0,1% становить 4,16 л. Для приготування однієї порції дезінфектору у відро на 5 л вносять 4,16 мл концентрату, додають 4,15 л водопровідної води, перемішують до повного

розчинення.				НУХТ БТЕК 04.01.42 КР ПЗ			
		№ докум.	Підпис				
Розроб.	Шубіна К.Р.			РОЗДІЛ 7 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Пенчук Ю.М.					64	97
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						

За генерального прибирання приміщень необхідна кількість робочого розчину з концентрацією 0,5% становить 8,73 л. Для приготування однієї порції мийного розчину у відро об'ємом 10 л вносять 44 мл концентрату, додають 8,7 л водопровідні води, та перемішують до повного розчинення.

ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1 Щоденне прибирання.

Щоденне прибирання приміщень проводиться за допомогою мийно-дезінфікуючого засобу – БАЦИЛКВІД ЛОНГ (від ДР 1.1.2.) концентрацією 0,1 %.

ДР 1.2.2 Генеральне прибирання

Для обробки виробничих приміщень при генеральному прибиранні використовують розчин БАЦИЛКВІД ЛОНГ (від ДР 1.1.2.) концентрацією 0,5%. Генеральне прибирання проходить раз на місяць та включає окрім підлоги також миття дверей, стін та вікон. Після прибирання проводять мікробіологічний контроль поверхонь. Перевіряють показник мікробного обнасення поверхонь, значення КУО має бути меншим за 1000.

ДР 1.3 Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1 Миття та ополіскування обладнання

Для миття обладнання та комунікацій застосовують мийні розчин (від ДР. 1.1.1) підігріті до температури 55°C.

Пристрій для безрозбірного миття (CIP мийка) підключається гнучким шлангом до розпилювача, вбудованого в обладнання, а режим очищення встановлюється, коли розчин для миття вже готовий до використання.

З'єднують відповідне обладнання та мобільну мийку CIP за допомогою трубки. Потім підключіть розпилювач і вимикають всю систему, крім виходу мийного засобу. Відповідно до встановленого режиму очищення, CIP - обладнання для очищення подається робочий розчин: 15 хвилин ополіскування, 30 хвилин миття розчином, 15 хвилин ополіскування. Мийний розчин

циркулює і повторно використовується для наступного миття. Після декількох циклів миття використаний миючий засіб і вода утилізуються.

ДР 1.3.2 Технічний огляд

Після очищення та промивання перевіряють комунікації та систему заповнення обладнання на наявність витоків. У разі пошкодження затягують різьбові з'єднання.

ДР 1.3.3 Перевірка обладнання на герметичність

Закривають всі герметичні отвори апарату і заповнюють його повітрям за допомогою насоса до рівня надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Після цього вимикають подачу повітря і фіксують в робочому журналі значення манометра та час витримки (30-60 хвилин). Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, обладнання вважається герметичним. В іншому випадку для пошуку витоків використовують галогеновий течешукач. У пристрій додається невелика кількість чотирохлористий карбон і вся ділянка ущільнення знову герметизується. Обладнання нагрівають до температури 80 °С і встановлюють тиск 0,2 МПа. Пари небезпечних речовин проникають через негерметичні отвори і фіксуються зондом зустрічного течешукача. Тривалість визначення на герметичність – 1 година. При виявленні витoku його усувають, а потім проводять зворотний тест.

ДР 1.3.4 Стерилізація обладнання

Нагрів обладнання. Розігривають апарат за допомогою подачі глухої пари до сорочки до температури 80-90 °С.

Стерилізація апаратури. Закривають всі наповнювальні пристрої з відкритими кінцями трубок і комунікації, що підключені до пристрою, та подають гарячу пару безпосередньо в пристрій через нижній отвір, потім відкривають витяжний вентиляційний отвір, щоб випустити повітря з пристрою. Коли обладнання досягне постійної температури 130-135 °С, закривають запірні пристрої, крім правого, і залишають на 1,5 години (тиск 0,15 МПа).

Охолодження. Вимикають всю систему подачі пари. Потім заповнюють сорочку холодною водою. Охолодження обладнання має дійти до досягнення температури 30-40 °С, при цьому спостерігається утворення пари, що вирішують відкриттям клапана подачі стерильного повітря для стабілізації.

ДР 1.4 Підготовка персоналу

Окрім навчання персоналу, проводяться також гігієнічні тренінги у вигляді інструктажів щодо правил користування станціями для миття рук та обладнанням для прибирання, приміщеннями тощо.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають за допомогою повітрозабірника (ПЗ-1) у найвищій точці – на висоті 10 м (висота поверху – 6 м, кількість поверхів – 1, косий дах будівлі (~1,5 м), + 2-3 метри), де розміщують обладнання для стиснення та очищення повітря.

ДР 2.2. Очищення повітря від грубих часток

Попереднє очищення повітря проводять у фільтрі (Ф-2), що забезпечує ступінь очищення до 90%, затримуючи при цьому частинки діаметром 50 мкм.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Стискання повітря здійснюють у компресорі (К-3), щоб забезпечити аерацію та подолати гідравлічний тиск стовпа рідини у ферментері. Умови процесу: тиск – 0,35 МПа, температура – до 250°C.

ДР 2.4. Охолодження повітря і видалення зайвої вологи

Стиснене повітря, утворене при компресуванні, (від ДР 1.3) надходить до теплообмінника-охолоджувача (Т-4), де охолоджується до температури 25-30°C. Згодом зайву вологу видаляють за допомогою ресивера (Р-5), де проходить усунення пульсацій руху повітря. На даному етапі показник вологості зменшується до 60%.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Охолоджене повітря (від ДР 1.4) надходить до теплообмінника-нагрівача (Т-6), де нагрівається до температури 45-50°C. На даному етапі показник вологості зменшується до 50%.

ДР 2.6. Очищення повітря у головному фільтрі

Нагріте повітря (від ДР 1.5) надходить до головного фільтра очистки (Ф-7), який ставлять біля ферментаційних відділень. На даному етапі ступінь очищення складає 95%.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря (від ДР 1.6) через трубопроводи подається безпосередньо в індивідуальні фільтри (ІФ-8, ІФ-22) кожного з біореакторів до ТП 4.5, ТП 5.1. Ступінь кінцевої очистки повітря складає 99,999% та КУО < 1.

ДР 3. Приготування титрувальних розчинів

ДР 3.1. Приготування 6%-го розчину HCl

ДР 3.1.1. Приготування 6%-го розчину HCl для підкислення середовища у ферментері об'ємом 10 л

Для приготування 12 мл 6%-го розчину HCl у стерильну колбу об'ємом 25 мл додають за допомогою мірного циліндра на 25 мл додають 10 мл стерильної води і вносять за допомогою стерильної мірної піпетки на 2 мл при постійному перемішуванні 2 мл 37%-ого розчину HCl. Всі процеси на цій стадії проводять в умовах асептики (в ламінарному боксі).

ДР 2.2. Приготування і стерилізація 6%-го розчину NaOH

ДР 2.2.1. Приготування 6%-го розчину NaOH для підлужнення середовища у ферментері об'ємом 10 л

Для приготування 12 мл 6%-го розчину NaOH на технічних вагах зважують 0,72 г кристалічного їдкого натру. Наважку поміщають у колбу на 25 мл і за допомогою мірного циліндра на 25 мл додають 11 мл дистильованої води, перемішують до повного розчинення, закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві при 131 °C (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4. Приготування і стерилізація поживних середовищ

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках.

Для вирощування інокуляту потрібно 600 мл поживного середовища, враховуючи, що 10 % від об'єму поживного середовища – це посівний матеріал (60 мл)

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках наведений у табл.5.7 (розділ 5). Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 4.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 1,5 г глюкози. Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл, доливають дистильовану воду (0,1 л), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 4.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 10,2 г триптоні і 1,8 г соєвого пептону. Наважки поміщають у колбу об'ємом 500 мл, додають дистильовану воду (0,25 л), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 120 °С (0,1 МПа) протягом 30 хв.

ДР 4.1.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 3 г NaCl, 1,5 г K₂HPO₄ і 5,4 глутамату натрію. Наважки поміщають у колбу об'ємом 500 мл, додають дистильовану воду (0,25 л), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 131 °С (0,05 МПа) протягом 40 хв.

ДР 4.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 10 л.

Для вирощування інокуляту потрібно 6000 мл поживного середовища, враховуючи, що 10 % від об'єму поживного середовища – це посівний матеріал (600 мл), а також утворюваний конденсат – 500 мл.

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках наведений у табл.5.8 (розділ 1). Дані розрахунків заокруглено для практичної зручності.

ДР 4.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних терезах зважують 15 г глюкози. Наважку поміщають у колбу об'ємом 2 л, доливають дистильовану воду (1 л), перемішують, закривають ватно-марлевым корком і стерилізують в автоклаві при 112 °С (0,05 МПа) протягом 30 хв.

ДР 4.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних терезах зважують 102 г триптоні і 18 г соєвого пептону. Наважки переносять у реактор-змішувач на 5 л (РЗ-9), додають 2,5 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій і стерилізують при 120 °С (0,1 МПа) протягом 30 хв. Отриманий простерилізований розчин подають самоплином у попередньо простерилізований інокулятор (І-11) об'ємом 10 л.

ДР 4.2.3. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних терезах зважують 30 г NaCl, 15 г K₂HPO₄ і 54 г глютамату натрію. Наважки поміщають у реактор-змішувач (РЗ-10) об'ємом 5 л, додають через лічильник питну воду (2,5 л) та вмикають перемішуючий пристрій. Для кращого розчинення компонентів у сорочку реактора подають пару, щоб досягти температури у реакторі на рівні 40°С. Отриманий розчин перекачують самоплином в ферментері (Ф-11) об'ємом 10 л, і стерилізують при 131 °С (0,15 МПа) протягом 40 хв.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Отриману колекційну культуру *Staphylococcus aureus* SA564-acnA::ermB зберігають у пробірці на скошеному щільному агаризованому середовищі (триптозо-соєвий агар [2]). Пересіви на свіже поживне середовище проводять 1 – 2 рази на місяць. Усі роботи із колекційною культурою проводять із дотриманням правил асептики.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Колекційну культуру *S. aureus* SA564-acsA::ermB розсівають на чашки Петрі із триптозо-соєвим агаром для одержання ізольованих колоній. Вирощують у термостаті при температурі 37 °С (24 год).

ТП 5.3. Вирощування інокуляту у пробірках на агаризованих середовищах

Отримані ізольовані колонії *S. aureus* SA564-acsA::ermB із чашок Петрі (від ТП 5.2) пересівають петлею у пробірки зі скошеним триптозо-соєвим агаром (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). У пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування становить 24 годин, температура 37 °С. Кожні 4 год із пробірок відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю.

ТП 5.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 1 л зі стерильною композицією В (від ДР 4.1.3) вносять простерилізовану композицію Б (від ДР 4.1.2), вносять композицію А (від ДР 4.1.1), перемішують і розливають по 150 мл у 4 стерильні качалочні колби об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *S. aureus* SA564-acsA::ermB (від ТП 5.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини, стерильною піпеткою відбирають отриману суспензію бактерій і вносять у качалочні колби із поживним середовищем. Для засіву 1 колби використовують дріжджову суспензію, одержану з 1 пробірки.

Культивують на качалках (225 об/хв) при температурі 37 °С упродовж 12 год, рН 6,8-7,0, після чого визначають концентрацію біомаси, яка повинна становити 1,3 г/л, і здійснюють мікробіологічний контроль. Після проведення мікробіологічного контролю культуральну рідину зливають у засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 6. Виробничий біосинтез

ТП 6.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 100 л

У ферментер (Ф-11) із простерилізованою композицією В (від ДР 4.2.3), самоплином подають композицію А (від ДР 4.2.1) і композицію Б (від ДР 4.2.2), вмикають перемішуючий пристрій, подають 6 %-ий розчин HCl (від ДР 3.1.1) і 6%-ий розчин NaOH (від ДР 3.2.2) до досягнення рН середовища за показником датчика рН до 5,8-6,0. Через засівну колбу вносять посівний матеріал (від ТП 5.4). Культивують при температурі 37 °С і концентрації розчиненого кисню ($pO_2 = 20 - 30 \%$ від насичення повітря) упродовж 12 год. Підтримання pO_2 на заданому рівні здійснюють регулюванням швидкості перемішування і рівня аерації (витрати стерильного аераційного повітря).

Кожні 4 год із ферментера відбирають проби культуральної рідини для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації анатоксину (1,3 г/л). Концентрація біомаси на кінці культивування має становити 6,26 г/л.

Після закінчення процесу біосинтезу культуральну рідину перекачують відцентровим насосом (Н-12) у цех виділення цільового продукту.

РОЗДІЛ 8

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Мікробіологічний контроль

У процесі культивування продуцента токсину кожні 4 години відбирають проби культуральної рідини для здійснення мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси, концентрації токсину, джерела вуглецю (глюкоза) та азоту (діамоній фосфат, триптон, соєвий пептон).

Мікробіологічний контроль реалізується шляхом висіву культури на чашки Петрі з агаризованими середовищами і наступним мікроскопіюванням.

Культуральну рідину розсівають мікробіологічною петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з триптон-соєвим агаром (ТСА) або м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, а також з сусло-агаром (СА) для виявлення дріжджів та грибів [67].

Мікроскопіювання здійснюють у світловому мікроскопі з імерсійною системою. Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять краплину культуральної рідини. Краплю розподіляють по склу петлею, при цьому діаметр мазка має становити близько 1 см. Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Після цього на сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1-2 краплини імерсійного масла. По закінченню роботи ваткою, змоченою етиловим спиртом, прибирають залишки масла з імерсійного об'єктива [67].

					НУХТ БТЕК 04.01.42 КР ПЗ		
		№ докум.	Підпис				
Розроб.	Шубіна К.Р.			РОЗДІЛ 7 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Пенчук Ю.М.					73	97
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков В.П.						

Стафілококи представляють собою клітини сферичної форми діаметром 0,5- 1,5 мкм. Оскільки поділ клітин відбувається у трьох взаємно перпендикулярних площинах, взаємне розташування клітин у мазках нагадує грона винограду. У зразках клінічного матеріалу стафілококи можуть розташовуватись у вигляді окремих клітин, парами клітин або коротенькими ланцюжками. Стафілококи нерухливі і не утворюють спор. Клітинна стінка багатьох стафілококів вкрита полісахаридною капсулою. У *S. aureus* навіть ідентифіковані різні серотипи антигенів капсули [68].

Так, мікроорганізми серотипів 1 і 2 мають товстий капсулярний шар і утворюють слизисті колонії. Мікроорганізми, що відносяться до цих серотипів зрідка викликають захворювання у людей. Проте, мікроорганізми-носії серотипів 5 та 8 мають високий патогенний потенціал і часто індукують розвиток патологічних станів людини. Капсула, як відомо, захищає бактерій від фагоцитозу клітинами природної ланки імунітету. Крім того, більшість стафілококів продукують речовину слизистого шару (slime layer or biofilm), що містить моносахариди, білки, невеликі пептиди. Ця речовина може бути утворена в різних кількостях за потребою. Речовина слизистого шару дозволяє адгезувати бактеріям до клітин тканин хазяїна або до інертних речовин клапанів, катетерів, шунтів. Крім того, ця речовина є особливо важливою для виживання авірулентних коагулазо-негативних стафілококів.

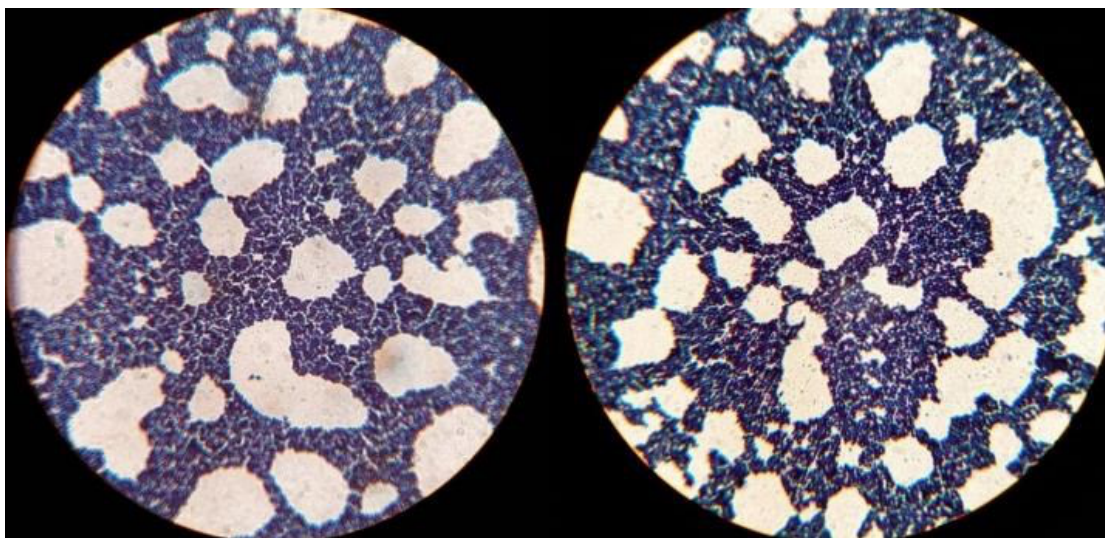


Рис. 4.1. Мікрофотографія клітин *S. aureus* (забарвлення за Грамом, Ок. $\times 10$, Об. $\times 100$) [68].

На щільних поживних середовищах вони утворюють округлі, дрібні, непрозорі, гладенькі колонії з рівними краями діаметром 1-4 мм вже через 24 години культивування. При культивуванні в аеробних умовах на щільних поживних середовищах з вмістом крові, молока, картоплі чи вуглеводів стафілококи утворюють каротиноїдні пігменти. Колір пігментів може бути різний від кремового до жовтого. Як правило, виражений «золотистий» колір спостерігають у колоній *S. aureus*, звідки і походить назва цього виду стафілококів. У різних штамів одного і того ж виду стафілококів колір пігменту може дещо відрізнятись. Тому пігментоутворення не є диференційною (видовою) ознакою. У анаеробних умовах чи при рості у рідкому поживному середовищі стафілококи не утворюють пігмент. У м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) стафілококи ростуть з рівномірним помутнінням середовища з наступним випадінням незначного осаду. Через 2-3 добу росту на поверхні рідкого поживного середовища утворюється плівка і пристінкове кільце. Стафілококи можуть рости при температурі від $+18^{\circ}\text{C}$ до $+40^{\circ}\text{C}$, проте температурним оптимумом росту є діапазон температур - $25-35^{\circ}\text{C}$ [68].

8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.2.1. Концентрація біомаси

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії (непрямий метод) з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка. У пробірки із 9 мл дистильованої води вносять по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтують, після чого вимірюють оптичну гуστину при довжині хвилі 540 нм, отримані дані перераховують за калібрувальним графіком [69].

8.2.2. Концентрація токсину

Кількість токсину, синтезованого *S. aureus* SA564-*acnA::ermB*, можна визначити за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) у супернатанті культуральної рідини.

Аліквоти культуральної рідини (1,5 мл) центрифугували протягом 5 хв при 20800 об/хв охолодженій центрифугі, супернатанти відбирали та зберігали при 20°C до використання [2].

Згідно роботи [70], методика визначення є наступною. Колонку Resource PHE 1 мл використовували з градієнтом від 10%–90% буфера В [буфер А: 0,1% трифторуксусної кислоти (TFA) у воді; буфер В: 0,1% TFA в ацетонітрилі] в об'ємі 15 колонок зі швидкістю потоку 2 мл/хв.

Загальний час аналізу складає приблизно 14 хв, включаючи продування колонки (об'єми 3 колонок при 100% буфері В) і врівноваження (об'єми 4 колонок при 0% буфері В). Після введення зразка (500 мл), перед початком градієнта через колонку пропускали 6 об'ємів 10% буфера В. Використовували систему ВЕРХ Kontron, оснащену спектрометром із діодною матрицею Kontron DAD 440 (BioTEK Kontron, Нойфарн, Німеччина).

8.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Джерелом вуглецю у даному середовищі є глюкоза, тому концентрацію даного субстрату в культуральній рідині можна визначити за допомогою високоефективної рідинної хроматографії.

Метод ВЕРХ засновано на визначенні зміни площі піка глюкози на хроматограмі залежно від її кількості. Так, при необхідності розчин проби слід розвести до концентрації, що лежить в інтервалі лінійності калібрувального графіка [71].

Методика визначення : культуральну рідину центрифугують при 9000 об/хв протягом 5 хв (Microfuge 20 Series, Beckman Coulter Inc., Brea, CA) і потім фільтрують через целюлозний фільтр (PALL) з розміром пор 0,2 мкм. Після цього супернатант аналізують за допомогою ВЕРХ, оснащеної 2414 Детектором Рефракції та колоною НРХ-87Н Aminex (300 × 7,8 мм, Bio-Rad, Hercules, Каліфорнія) при 50° С та 410 нм (зразок не розбавляють). В якості рухомої фази використовують 0,05 М розчин сульфатної кислоти. Зразки зберігають за температури 4° С на час проведення визначення [72].

Джерелами азотного живлення є органічні та неорганічні сполуки, що містяться у поживному середовищі. Зважаючи на це, визначають кількість загального азоту.

За допомогою класичних аналітичних методів аналізу не завжди вдається провести належний аналіз якості сировини, та й саме проведення аналізів вимагає багато часу, реагентів, а результати залежать від кваліфікації того, хто проводить аналізи. Тому актуальним на даний момент є використання сучасних інструментальних методів аналізу, які мають суттєві переваги над класичними [73].

Серед низки інструментальних методів велику увагу привертають спектрометричні методи досліджень, що ґрунтуються на вибірковій взаємодії електромагнітних хвиль з атомно-молекулярною будовою досліджуваних речовин. У цьому відношенні провідне місце відводять методу інфрачервоної спектроскопії в ближньому діапазоні. Тому саме цим методом будемо визначати загальну кількість азоту [73].

Таблиця 8.1

Характеристика методу визначення вмісту азоту

Значення	Метод БІЧ-спектрометрії
Дослідний зразок	Без руйнувань
Пробопідготовка	Відсутня
Час проведення аналізу	20-40 с.
Необхідність витратних матеріалів	Відсутня
Підготовка спеціаліста	Середня або відсутня
Необхідність прекурсорів	Ні
Місце проведення аналізу	Лабораторія або виробництво
Робота з високою температурою	Ні

Шкода для навколишнього середовища	Відсутня
------------------------------------	----------

Межа ближнього інфрачервоного електромагнітного випромінювання знаходиться в діапазоні довжин хвиль від 800 нм до 2500 нм (хвильових чисел від 12500 до 4 000 cm^{-1}), тобто вона межує з середньою інфрачервоною межею з великою довжиною хвилі і з видимою межею коротших хвиль. В основі методу інфрачервоної спектроскопії лежить поглинання/пропускання, відбивання або розсіювання інфрачервоного випромінювання при проходженні через дослідні зразки, та подальшим порівнянням одержаного спектру з результатами бази даних калібрувань. Електромагнітні хвилі в цьому діапазоні спектра взаємодіють з коливальними рухами атомів та молекул у структурі реагентів. На відміну від загальноприйнятого аналізу та ідентифікації окремих смуг поглинання у середньому діапазоні ІЧ частот, тобто спектрометричний підхід, у ближньому діапазоні використовується хемометрична методика, що полягає у встановленні кореляції між вмістом окремого компонента у суміші та інтенсивністю відповідних коливань у спектрі. Поглинання в БІЧ діапазоні пов'язано з обертонами основних коливальних частот зв'язків C–H, C=O, N–H, O–H, S–H і їх комбінацій.

Основною перевагою методу інфрачервоної спектрометрії в ближньому діапазоні є можливість кореляції спектральної інформації з фізичними та хімічними властивостями і всі якісні і кількісні характеристики визначаються одночасно (одночасне кількісне визначення декількох компонентів багатокомпонентних сумішей), слабе затухання сигналу, відсутність пробопідготовки та використання розчинників, безконтактний вимір через скло, можливості вимірювання на відстані за допомогою волоконно-оптичних датчиків, час аналізу – кілька секунд. Метод БІЧ-спектрометрії для контролю якості різних об'єктів сьогодні введений до числа офіційно прийнятих у багатьох країнах [73].

РОЗДІЛ 9

АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Системи знешкодження рідких відходів

Утилізація стічних вод, що утворилися під час виробництва стафілококового анатоксину, зазвичай відповідає суворим інструкціям і нормам, щоб забезпечити належне поводження та захист навколишнього середовища. Потрібно забезпечити такі вимоги [74]:

- **Очищення:** Стічні води від виробництва вакцин проходять процес очищення для видалення забруднень. Це може включати фізичні, хімічні та біологічні методи очищення для усунення або зменшення концентрації органічних речовин, важких металів та інших шкідливих речовин. Процеси обробки часто включають такі етапи, як осадження, фільтрація, адсорбція активованим вугіллям і дезінфекція. Розділення та попереднє очищення на початкових стадіях тверді та рідкі компоненти стічних вод відокремлюються для полегшення ефективного очищення. Тверді відходи, такі як клітинна біомаса або інше сміття, зазвичай видаляють за допомогою таких процесів, як седиментація, фільтрація або центрифугування. Цей крок допомагає зменшити органічне навантаження та полегшує подальші процеси очищення.

- **Дезінфекція:** після первинної обробки часто використовується, щоб гарантувати усунення будь-яких патогенів, що залишилися. Загальні методи дезінфекції включають хлорування, ультрафіолетове (УФ) опромінення або озонування. Цей крок має вирішальне значення для запобігання викиду шкідливих мікроорганізмів у навколишнє середовище.

- **Відповідність нормативним стандартам:** виробники вакцин повинні дотримуватися місцевих екологічних норм і стандартів щодо утилізації стічних

				<i>НУХТ БТЕК 04.01.42 КР ПЗ</i>			
		<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Шубіна К.Р.</i>			РОЗДІЛ 9 АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Пенчук Ю.М.</i>					79	97
<i>Реценз.</i>					79		
<i>Н. Контр.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>						

вод. Ці правила можуть визначати допустимі ліміти різних забруднювачів і забруднень у стічних водах, а також необхідні методи очищення. Відповідність гарантує, що стічні води відповідають необхідним стандартам якості перед утилізацією [74].

- Моніторинг стічних вод: Регулярний моніторинг і тестування стічних вод проводяться для оцінки їх якості та забезпечення відповідності нормативним вимогам. Це передбачає аналіз зразків на різні параметри, такі як рН, біохімічна потреба в кисні (БПК), загальна кількість завислих речовин (TSS) і специфічні забруднення, що викликають занепокоєння. Моніторинг допомагає виявити будь-які відхилення від допустимих меж і дозволяє вжити коригувальних дій.

- Безпечний скид або переробка: після того, як стічні води пройшли відповідну обробку та відповідають необхідним стандартам якості, їх можна скидати в навколишнє середовище. Скидання, як правило, здійснюється відповідно до місцевих правил і дозволів, гарантуючи, що воно не становить ризику для навколишньої екосистеми чи здоров'я населення.

Виробники вакцин працюють у співпраці з експертами з охорони навколишнього середовища та регуляторними органами, щоб забезпечити належну обробку, контроль та утилізацію стічних вод, які утворюються під час виробництва вакцин [75].

Відпрацьовані миючі засоби розводяться до малої концентрації зливаються у каналізацію, потім очищується та зливається у водоймище.

Для очищення стічних вод пропонується використовувати ультрафільтрацію. Ультрафільтрація — це процес мембранної фільтрації, подібний до зворотного осмосу, який використовує гідростатичний тиск для проштовхування води через напівпроникну мембрану. Розмір пор ультрафільтраційної мембрани зазвичай становить 103-106 дальтон. Ультрафільтрація є бар'єром, що створюється тиском для зважених твердих частинок, бактерій, вірусів, ендотоксинів та інших патогенів для

отримання води дуже високої чистоти. Завислі тверді та розчинені речовини з високою молекулярною масою затримуються, а вода та розчинені речовини з низькою молекулярною масою проходять через мембрану [76].

Але потрібно пам'ятати про попередню очистку перед застосуванням процесів мембранного очищення, тому що це відіграє невід'ємну роль в успішному мембранному процесі. Різні методи застосовуються як попередня обробка для попереднього кондиціонування потоків для розділення мембраною. Фізико-хімічні методи, такі як коагуляція, адсорбція та пом'якшення, застосовуються для попереднього очищення стічних вод перед розділенням мембраною. Ці фізико-хімічні методи попередньої обробки є ефективними для видалення зважених твердих речовин і органічних забруднювачів, які мають високу здатність засмічувати мембрану. Існує також комбінація коагуляції/флокуляції та адсорбції як методів попередньої обробки для мембранних процесів. Це необхідно для подальшого посилення видалення розчинених і колоїдних речовин [77].

9.2 Системи знешкодження газоподібних відходів

Відпрацьоване повітря очищується на виході з ферментеру у фільтрі з розміром мембрани 0,2 мкм, що затримує аерозолі в тому числі клітини. Цей фільтр потім піддається термічній обробці.

9.3. Системи знешкодження та утилізації твердих відходів

Пропонується використати систему очищення відходів з інтегрованим стерилізатором та шредером Celitron. Це великий паровий стерилізатор із вбудованим подрібнювачем, призначений для переробки біологічно небезпечних відходів на місці в лабораторіях, виробництвах. У процесі стерилізації не використовуються хімічні речовини, система використовує для стерилізації лише чисту пару. ISS виконує як подрібнення, так і стерилізацію відходів в одній ємності, щоб виключити можливість будь-якого перехресного забруднення. Ємність оснащена валом із приводом від двигуна та потужними лезами для подрібнення/дроблення, які зменшують розмір і об'єм відходів.

Пропонує індивідуальні рішення для утилізації біологічних інфекційних відходів у виробництві вакцин із повністю автоматизованими системами обробки витратних матеріалів інфекційних лабораторій. Ця інноваційна технологія сприяє швидшому виробництву вакцин і простішій та ефективнішій утилізації лабораторних відходів. Немає потреби у спеціальному місці для зберігання одноразових біологічних інфекційних матеріалів (лабораторні витратні матеріали,). За допомогою цієї установки відходи негайно видаляються та автоматично транспортуються в стерилізаційну камеру. Він потрапляє в компактор, а потім у інтегрований стерилізатор і подрібнювач (ISS) для обробки та переробки. Після процесу відходи є стерильними, перетопленими, фрагментованими, нетоксичними, здебільшого твердими та можуть утилізуватися як звичайні міські відходи [78].

Біомасу піддають спалюванню.



Рис. 9.1 Система очищення відходів з інтегрованим стерилізатором та шредер [78]

РОЗДІЛ 10

НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА

Заявка на ліцензію на біологічні препарати : це вичерпний документ, який подається до регуляторних органів для отримання дозволу продаж вакцини. Він містить дані доклінічних і клінічних досліджень, інформацію про виробництво, дані про безпеку та ефективність, а також запропоноване маркування.

Поточна документація належної виробничої практики (cGMP): це настанови та стандарти, які окреслюють вимоги до виробництва, контролю якості та розповсюдження вакцин. Документація включає стандартні операційні процедури (SOP), записи партій, протоколи перевірки та звіти, що демонструють відповідність положенням cGMP.

Документація системи якості: включає документацію, пов'язану із системами управління якістю, наприклад, процедури контролю якості (QC), протоколи забезпечення якості (QA), а також документацію про тестування контролю якості та критерії випуску для кожної партії вакцини.

Дослідження стабільності: вакцини повинні пройти дослідження стабільності, щоб визначити термін придатності та умови зберігання. Документація дослідження стабільності містить дані про стабільність вакцини протягом тривалого часу, включаючи такі фактори, як температура, вологість і вплив світла.

Документація з фармаконагляду: ця документація передбачає звітування про побічні явища, моніторинг безпеки вакцини та забезпечення постійної оцінки ризиків і переваг вакцини. Він містить документацію, пов'язану зі звітами про несприятливі події, плани управління ризиками та періодичні оновлені звіти про безпеку.

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.42 КР</i>		
		<i>ІІЗ № докум.</i>	<i>Підпис</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Шубіна К.Р.</i>			<i>РОЗДІЛ 10 НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Пенчук Ю.М.</i>					83	97
<i>Реценз.</i>					<i>Кафедра БТМ</i> 83		
<i>Н. Контр.</i>							
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>						

Документація перевірки: ця документація надає докази того, що виробничі процеси, обладнання та аналітичні методи, які використовуються у виробництві вакцин, підтверджені та відповідають заздалегідь визначеним специфікаціям. Він містить протоколи, звіти та дані, отримані під час валідаційних досліджень.

Записи про основні партії: це детальні документи, які визначають процедури, матеріали та обладнання, що використовуються для виробництва кожної партії вакцини. Записи основних партій містять покрокові інструкції щодо виробничого процесу, тестування контролю якості та критерії випуску партії.

Регуляторні інспекції та аудити: документація, пов'язана з регулятивними інспекціями та аудитами, включаючи аудиторські звіти, висновки інспекцій та відповіді на регулятивні спостереження або недоліки, також може бути частиною нормативної документації щодо виробництва вакцин.

1. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.9:2020 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика»

2. Настанова МОЗ України 42-01-2003 від 13.03.2003 р. «Лікарські засоби. Технологічний процес. Документація»

3. Міжнародні стандарти ISO серії 9000, 10000, 114000 та SA 8000.

4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науковоекспертний фармакопейний центр» – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556с.

5. ДСТУ ISO 9000 – 2001 Системи управління якістю. Основні положення та словник. Вимоги.

6. ДСТУ 8115:2015 Біотехнологія. Методи попередження контамінації культур клітин

7. ДСТУ EN 13053:2013 Системи вентиляції та кондиціонування повітря. Кондиціонери повітря центральні. Номінальні та робочі характеристики складових частин та секцій (EN 13053:2006, IDT)

8. Настанова 42-3.3:2004 Лікарські засоби. Випробування стабільності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Макарова О. Є., Пенчук Ю. М., Гергель М. В. Сучасний стан розробки та застосування вакцин. *ПРОБЛЕМИ СУЧАСНОЇ ВАКЦИНОЛОГІЇ*. 2011: 39-42.
2. Greg A. Somerville, Alan Cockayne, Manuela Durr, Andreas Peschel, Michael Otto, James M. Synthesis and Deformylation of *Staphylococcus aureus* δ -Toxin Are Linked to Tricarboxylic Acid Cycle Activity. *Journal of bacteriology*. 2003, 185(22): 6686–6694. <https://doi.org/10.1128/jb.185.22.6686-6694.2003>
3. Анатоксин. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2779/anatoksin>
4. Doyle M. P Food safety: bacterial contamination. Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition). 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00124-0>
5. The State Pharmacopoeia of Russian Federation. 12th ed. V. 1. Moscow: Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation; 2007 (in Russian).
6. Landrum M. L., Lalani T., Niknian M., Maguire J. D., Hospenthal D. R., Fattom A., et al. Safety and immunogenicity of a recombinant *Staphylococcus aureus* α -toxoid and a recombinant Panton-Valentine leukocidin subunit, in healthy adults. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2017, 13(4): 791-801. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1248326>
7. Kota R. K., Kolla H. B., Reddy P. N., Kalagatur N. K., Samudrala S. K. Immunoinformatics analysis and evaluation of recombinant chimeric triple antigen toxoid (r-HAB) against *Staphylococcus aureus* toxemia in mouse model. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021, 105: 8297-8311. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11609-z>
8. Schlievert P. M. Staphylococcal Enterotoxin B and C Mutants and Vaccine Toxoids. *Microbiology Spectrum*. 2023: e04446-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04446-22>

9. Грубер И.М., Егорова Н.Б., Асташкина Е.А. Факторы патогенности *Staphylococcus aureus* - их роль в инфекционном процессе и в формировании поствакцинального иммунитета. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2016, 15(3):72-82. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-3-72-82>.

10. BD™ Tryptic Soy Broth (TSB) [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://legacy.bd.com/europe/regulatory/assets/ifu/hb/ce/ba/ba-257107.pdf>.

11. Todd Olivia A., Noverr Mairi C., Peters Brian M., Mitchell Aaron P. *Candida albicans* Impacts *Staphylococcus aureus* Alpha-Toxin Production via Extracellular Alkalinization. *mSphere*. 2019, 4(6): 1-12. doi:10.1128/msphere.00780-19.

12. Склад білків. [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://cpo.stu.cn.ua/Oksana/harch_himia_lab_prakt/150.html#:~:text=%D0%97%D0%B0%D0%B7%D0%B2%D0%B8%D1%87%D0%B0%D0%B9%20%D0%B1%D1%96%D0%BB%D0%BA%D0%B8%20%D1%81%D0%BA%D0%BB%D0%B0%D0%B4%D0%B0%D1%8E%D1%82%D1%8C%D1%81%D1%8F%20%D0%B7%20%D0%B2%D1%83%D0%B3%D0%BB%D0%B5%D1%86%D1%8E,..2%2C5%25\)](https://cpo.stu.cn.ua/Oksana/harch_himia_lab_prakt/150.html#:~:text=%D0%97%D0%B0%D0%B7%D0%B2%D0%B8%D1%87%D0%B0%D0%B9%20%D0%B1%D1%96%D0%BB%D0%BA%D0%B8%20%D1%81%D0%BA%D0%BB%D0%B0%D0%B4%D0%B0%D1%8E%D1%82%D1%8C%D1%81%D1%8F%20%D0%B7%20%D0%B2%D1%83%D0%B3%D0%BB%D0%B5%D1%86%D1%8E,..2%2C5%25)).

13. Zapata-Vélez A. M., Trujillo-Roldán M. A. The lack of a nitrogen source and/or the C/N ratio affects the molecular weight of alginate and its productivity in submerged cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Annals of microbiology*. 2010, 60(4): 661-668. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0111-7>

14. *Staphylococcus aureus*. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://tgw1916.net/Staphylococcus/aureus.html>

15. Jumaah N., Joshi S. R., Sandai D. Prevalence of bacterial contamination when using a diversion pouch during blood collection: a single center study in Malaysia. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*. 2014, 21(3): 47.

16. *Staphylococcus aureus*- An Overview. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://microbenotes.com/staphylococcus-aureus/>

17. Beavers W. N., Monteith A. J., Amarnath V., Mernaugh R. L., Roberts L. J., Chazin W. J., et al. Arachidonic acid kills *Staphylococcus aureus* through a lipid peroxidation mechanism. *Mbio.* 2019, 10(5): e01333-19. <https://doi.org/10.1128/mbio.01333-19>
18. Missiakas D. M., Schneewind O. Growth and laboratory maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Current protocols in microbiology.* 2013, 28(1): 9C-1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6211185/>
19. Ye M., Sun L., Yang R., Wang Z., Qi K. The optimization of fermentation conditions for producing cellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application to goose feed. *Royal Society open science.* 2017, 4(10): 171012. <https://doi.org/10.1098/rsos.171012>
20. *Staphylococcus aureus*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus
21. Діагностика стафілокока, симптоматика та лікування інфекції. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://biocor-tech.com/blog/diagnostika-stafilokoka-symptomatyka-ta-likuvannya>
22. ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ, СПРИЧИНЕНИХ ЗОЛОТИСТИМ СТАФІЛОКОКОМ В ТЕРНОПОЛІ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ternopil.oxford-med.com.ua/viddilennya/infekciyne-viddilenna/likuvanna-zahvoruvan-sprychynenyh-zolotystym-stafilokokom/>
23. Стафілококова інфекція. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://medlabtest.ua/uk/articles/stafilokokkovaya-infekciya>
24. Foster T. J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS microbiology reviews.* 2017, 41(3): 430-449. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux007>
25. Анатоксин стафілококовий р-н д/ін. амп. 1 мл (10 од.). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://helsi.me/liki/kyiv/anatoxinum-staphilococcum/68087/instruction>
26. Анатоксин стафілококовий розчин д/ін. по 1 мл №10 в амп. [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://tabletki.ua/uk/%D0%90%D0%BD%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D0%BD-%D1%81%D1%82%D0%B0%D1%84%D0%B8%D0%BB%D0%BE%D0%BA%D0%BE%D0%BA%D0%BE%D0%B2%D1%8B%D0%B9/21987/>

27. Van Hal S. J., Jensen S. O., Vaska V. L., Espedido B. A., Paterson D. L., Gosbell I. B. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical microbiology reviews*. 2012, 25(2): 362-386. <https://doi.org/10.1128%2FCMR.05022-11>

28. Laupland K. B., Ross T., Gregson D. B. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: risk factors, outcomes, and the influence of methicillin resistance in Calgary, Canada, 2000–2006. *The Journal of infectious diseases*. 2008, 198(3): 336-343. <http://dx.doi.org/10.1086/589717>

29. Чисельність населення України. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://population-hub.com/ua/ua/population-of-ukraine.html>

30. Tsai C. M., Caldera J. R., Hajam I. A., Chiang A. W., Tsai C. H., Li H., et al. Non-protective immune imprint underlies failure of *Staphylococcus aureus* IsdB vaccine. *Cell host & microbe*. 2022, 30(8): 1163-1172. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.06.006>

31. KEGG Glycolysis / Gluconeogenesis - *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* USA300_FPR3757 (CA-MRSA). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.kegg.jp/pathway/saa00010>

32. Пирог Т.П., Скроцька О.І. Загальна мікробіологія [Електронний ресурс]: конспект лекцій для студентів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / Т.П. Пирог, О.І. Скроцька. – К.: НУХТ, 2018. – 106 с.

33. BLBIO-10SJ-100SJ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://blbiouisa.com/multistage-bioreactor-system/>

34. Пирог Т.П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: підручник / К.: НУХТ, 2009. – 336 с.

35. ДЕЗІНФІКУЮЧІ ЗАСОБИ. ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://medlan.net/uk/index.php?route=simple_blog/article/view&simple_blog_article_id=13

36. Дезінфекційні засоби. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.wiki-data.uk-ua.nina.az/%D0%94%D0%B5%D0%B7%D1%96%D0%BD%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D0%B9%D0%BD%D1%96_%D0%B7%D0%B0%D1%81%D0%BE%D0%B1%D0%B8.html

37. Інструкція під час роботи з дезінфекційними хімічними засобами. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pro-op.com.ua/article/767-nstruktsya-pd-chas-roboti-z-deznfeksynimi-hmchnimi-zasobami>

38. ДЕЗІНФЕКЦІЯ МЕДИЧНИХ ІНСТРУМЕНТІВ: ВИЗНАЧЕННЯ, ПРИНЦИПОВІ ПІДХОДИ, МЕТОДИ І ЗАСОБИ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/press/dezinfekciya-medicinskih-instrumentov.html>

39. ЗАГАЛЬНІ ПРАВИЛА ВИКОРИСТАННЯ ДЕЗІНФІКУЮЧИХ ЗАСОБІВ ТА АНТИСЕПТИКІВ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://blagodatnenska-gromada.gov.ua/news/1587464568/>

40. Формалін 37% 10 л 11 кг. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://33korovy.com.ua/ua/p1081296002-formalin.html>

41. Лізоформін 3000. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://hlorka.in.ua/ua/p276034221-lizoformin-3000-osnove.html?source=merchant_center&utm_source=google.pm&utm_medium=pc&utm_campaign=performance_max_ua&utm_content=&utm_term=&gclid=Cj0KCQjw_r6hBhDdARIsAMIDhV8Kfc7UJA5ZsIQEagtypPzSBCe_Ao5WQIRjGTi0iT9UTV3zTiLYK2QaAsSLEALw_wcB

42. БАЦИЛІКВІД ЛОНГ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/ua/catalog_item?attr_id=25067

43. Бланидас 300. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://med-line.com.ua/blanidas-3001>
44. Амінорм, 1 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://hlorka.in.ua/ua/p1798536628-aminorm.html>
45. Средство дезинфицирующее Гуасепт (Guasept), 1 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://medsolve.com.ua/meditsinskim-uchrezhdeniyam/dezinfektsiya/guasept-guasept-1000-ml-s-01-0299.html>
46. ДЕЗЕКОН ОМ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://interdez.com.ua/ru/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-desekon-om-baltiachemi-kiev>
47. Чистолайн Універсал. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://hlorka.in.ua/ua/p416344776-chistolajn-universal-dlya.html>
48. Дезінфікуючий засіб Полідез-А, 1 л (концентрат). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p257108626-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-polidez.html?&primelead=MS4wNzU>
49. Компоненти для виробництва миючих засобів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.systopt.com.ua/article-komponenty-dlya-proyzvodstva-moyushhyh-sredstv>
50. Гігієнічні вимоги до мийних засобів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://medbib.in.ua/gigienicheskie-trebovaniya-moyuschim.html>
51. Лужний мийний засіб Nerta. ВС-50 (25л). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1742738568-schelochnoe-moyuschee-sredstvo.html>
52. ПРОФІ 212. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1473889899-nizkopennoe-schelochnoe-moyuschee.html?&primelead=Mt42ODc1>
53. Лужне беспенное миющий засіб, SUPRA б\п, 12 кг. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1183533564-schelochnoe-bespennoe-moyuschee.html?&primelead=NC4z>

54. Концентрований кислотний низькопінний миючий засіб для видалення накипу та іржі GOOD RESULT 5л/каністра. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1667685489-kontsentririvannoe-nizkopennoe-kislotnoe.html?&primelead=NC4z>

55. Кислотне пінне миючий засіб Ekfil Foam A (кан. 23 кг). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1184674994-kislotnoe-pennoe-moyuschee.html?&primelead=M14xNQ>

56. Мийний кислотний безпінний засіб ANTIKALKEN FS1/f3. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1355234522-moyuschee-kislotnoe-bespennoe.html>

57. Повітрязабірник (ресивер) 300 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kms-market.com.ua/ua/p65371162-vozduhosbornik-resiver-300.html>.

58. Фільтр грубого очищення повітря JCB 3CX, 4CX Perkins. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://stkshop.kiev.ua/ua/p1647003826-32202602-filtr-gruboj.html>.

59. Турбокомпресори ID TURBO COMPRESSOR серії T2 (IHI-DALGAKIRAN). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/centrobizhni-kompresory-ih-dalgakiran-seriyi-t2/>.

60. Осушувачі. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dalgakiran.ua/uk/products/refryzheratorni-osushuvachi-stysnenogo-povitrya-dalgakiran-dryair-seriyi-dk>.

61. Ресивери ZELKO. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.zelko.ua/vozdhopodgotovka/resivery?gclid=CjwKCAjw49qKBhAoEiwAHQVT03bIMXMTbTvK7Ytv9QptHJcJ7JPXTFOv9ZIUH1KtZ2kqsVZ5UHSp6xoC4LIQAvD_BwE.

62. Теплообмінник (нагрівач повітря водяний). [Електронний ресурс]. Режим доступу:

https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php.

63. Вугільні компактні фільтри тонкої очистки. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://marganec.prom.ua/p644611206-ugolnye-kompaktnye-filtry.html>.

64. ВФ серія, фільтри у сталевому варному корпусі, 16 бар. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://compressory.org.ua/catalog_2/sistemy-podgotovki-szhatogo-vozduha/filtry/seriia-bf/.

65. Standard models for 5 ltr autoclave. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://amarequip.com/docs/500ml-5ltr%20Stirred%20Pressure%20Reactor%20Catalog.pdf>.

66. Перистальтичні насоси низького тиску. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tapflo.ua/products/hose-pumps/seriya-ptl#oglyad>.

67. Загальна мікробіологія і вірусологія: Лабораторний практикум для студентів напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання / Уклад. Т.П. Пирог, М.М. Антонюк, С.В. Ігнатенко. – К.: НУХТ, 2010. – 129 с.

68. Швець Ю.В. Методичні рекомендації до лабораторного практикуму зі спецкурсу "Біологічні основи інфекційних процесів" - Київ, 2019 - 56 с.

69. Standard models for 5 ltr autoclave. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://amarequip.com/docs/500ml-5ltr%20Stirred%20Pressure%20Reactor%20Catalog.pdf>

70. Otto Michael; Götz Friedrich. Analysis of Quorum Sensing Activity in *Staphylococci* by RP-HPLC of Staphylococcal δ -Toxin. *BioTechniques*. 2000, 28(6): 1088–1096. doi:10.2144/00286bm07.

71. . Федосенко Г. О. Вивчення залишкових кількостей глюкози на поверхнях фармацевтичного обладнання методами поляриметрії та ВЕРХ / Г. О. Федосенко, Ю. В. Скрипинець, І. І. Леоненко, А. В. Єгорова, С. М.

Кашуцький, В. П. Антонович // Фармацевтичний журнал. - 2015. - № 5. - С. 83-89.

72. Єфімов В., Тригуб І., Лісничка О. Визначення амінокислот в комбікормах методом обернено-фазової ВЕРХ шляхом дериватизації фенілізотіаціанатом. *Науково-технічний бюлетень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК*. 2014, 2(2): 62-67.

73. Кушнір Г. В. Характеристика сучасних методів визначення сирого протеїну у кормах та рослинній сировині / Г. В. Кушнір, Т. Р. Левицький, Г. П. Ривак, Л. В. Курилас, О. М. Вільха, Г. Ю. Федор // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія : Ветеринарні науки. - 2017. - Т. 19, № 82. - С. 97-100.

74. Утилізація вакцин [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://xn--80ancaco1ch7azg.xn--j1amh/uk/utilizatsiya-othodov/utilizatsiya-vaktsin/>

75. 7 Common Liquid Waste Disposal Methods [Electronic resource] access mode: <https://www.vlscs.com/2022/10/03/7-common-liquid-waste-disposal-methods/>

76. FlowMem-025 ультрафільтраційна пілотна установка з пластинчастими мембранами [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom-nasos.pro/ua/catalog/engineering/filtration-plants/ultrafiltration-microfiltration/flowmem-025-ultraf-ltrac-yna-p-lotna-ustanovka-z-plastinchastimi-membranami/>

77. Obotey Ezugbe E, Rathilal S. Membrane Technologies in Wastewater Treatment: A Review. *Membranes* (Basel). 2020 Apr 30;10(5):89. doi: 10.3390/membranes10050089

78. Система очищення відходів з інтегрованим стерилізатором та шредер (ISS) [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://celitron.com.ua/2018/07/22/biological-waste-treatment/>

ДОДАТКИ

Додаток 1

Determination of δ -toxin concentration. Aliquots of bacteria (1.5 ml) were centrifuged for 5 min at $20,800 \times g$ in a refrigerated centrifuge, and supernatants were removed and stored at -20°C until they were used. The concentration of δ -toxin was measured by HPLC as described previously (18). The method used for purification of δ -toxin for the chemotaxis assays has been described previously (18), except that the column size was increased and 50 ml of culture supernatant was used. Formylated δ -toxin and deformylated δ -toxin were identified by using an Agilent 1100 series chromatographic system equipped with a diode array detector and an LCMSD Trap VL mass spectrometer with an electrospray source (Agilent Technologies). The mass spectrometer was set to the positive mode with a target mass of 1,000 and a trap target of 50,000. The masses of formylated δ -toxin and deformylated δ -toxin were determined by averaging the mass spectra taken during elution of the corresponding peaks and by using the Agilent LCMSD Trap data analysis software for charge deconvolution.

Bacterial strains and growth conditions. *S. aureus* strain SA564 and an isogenic mutant strain with aconitase inactivated (SA564-*acnA::ermB*) have been described previously (24). *S. aureus* strains were grown in tryptic soy broth (TSB) (BD Biosciences) or on TSB containing 15 g of agar per liter. Liquid cultures were grown in TSB at 37°C with a flask volume-to-medium volume ratio of 10:1 and were aerated by shaking at 225 rpm.

In bacteria, translation initiates with formyl-methionine; however, the N-terminal formyl group is usually removed by peptide deformylase, an enzymatic activity requiring iron. *Staphylococcus aureus* δ -toxin is a 26-amino-acid polypeptide secreted predominantly with a formylated N-terminal methionine, which led us to investigate regulation of δ -toxin deformylation. We observed that during exponential and early postexponential growth, δ -toxin accumulated in the culture medium in formylated and deformylated forms. In contrast, only formylated δ -toxin accumulated after the early postexponential phase. The transition from producing both species of δ -toxin to producing only formyl-methionine-containing δ -toxin coincided with increased tricarboxylic acid (TCA) cycle activity. The TCA cycle contains several iron-requiring enzymes, which led us to hypothesize that TCA cycle induction depletes the iron in the culture medium, thereby inhibiting peptide deformylase activity. As expected, *S. aureus* depletes the iron in the culture medium between the postexponential and stationary phases of growth. Inhibition of δ -toxin deformylation was relieved by TCA cycle inactivation or by addition of supplemental iron to the culture medium. Of interest, peptides containing formyl-methionine are potent chemoattractants for neutrophils, suggesting that δ -toxin deformylation may have functional consequences. We found neutrophil chemotactic activity only with formylated δ -toxin. The *S. aureus* TCA cycle is derepressed upon depletion of rapidly catabolizable carbon sources; this coincides with the transition to producing only formylated δ -toxin and results in an increased inflammatory response. The proinflammatory response should increase host cell damage and result in the release of nutrients. Taken together, these results establish that there is an important linkage between bacterial metabolism and pathogenesis.