

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

**Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології**

«До захисту в ЕК»	«До захисту допущено»
Директор інституту(декан факультету) <u>Грегірчак Н.М.</u>	Завідувач кафедри <u>Пирог Т.П.</u>
(підпис) ініціали)	(підпис) ініціали)
«__» <u>червень</u> 2021 р.	«__» <u>червень</u> 2021 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми: «Біотехнологія»
на тему: Культивування *Nisseria gonorrhoeae* для одержання вакцини
гонококової

Виконала: здобувачка <u>4</u> курсу, групи <u>БТ-4-2</u> <u>Нагорна Аня Василівна</u> (прізвище , ім'я та по батькові повністю)	_____ (підпис)
Керівник: <u>Стабніков Віктор Петрович</u> (прізвище , ім'я та по батькові повністю)	_____ (підпис)
Консультанти: <u>Клименко О.М.</u> (прізвище та ініціали)	_____ (підпис)
_____ (прізвище та ініціали)	_____ (підпис)
_____ (прізвище та ініціали)	_____ (підпис)
Рецензент: <u>Бондар В.І.</u> (прізвище та ініціали)	_____ (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній
роботі немає запозичень із праць
інших авторів без відповідних
посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2021 р.

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 «Біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Пирог Т.П.

“ 01 ” квітня 20 21 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Нагорної Ані Василівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Nesseria gonorrhoeae* для одержання вакцини гонококової

керівник роботи: Стабніков Віктор Петрович професор д.т.н.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2021 року № 228-кв

2. Строк подання здобувачем роботи _____

3. Вихідні дані до роботи продуцент *Nesseria gonorrhoeae*, гонококова вакцина, 10 л ферметер, коефіцієнт заповнення 0,65 _____

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1.Характеристика готової вакцини, ,РОЗДІЛ 2.

Обґрунтування вибору штаму та характеристика *Neisseria gonorrhoeae*,

РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування, РОЗДІЛ 4. Біосинтез

цільового продукту РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної

схеми,РОЗДІЛ 6.Специфікація обладнання, РОЗДІЛ 7.Опис технологічної

схеми РОЗДІЛ 8.Контроль виробництва, РОЗДІЛ 9.Автоматизація ділянки

виробництва, РОЗДІЛ 10.Охорона довкілля _____

5. Перелік графічного матеріалу _____

Технологічна схема виробництва вакцини гонококової - 2 аркуші А1.

Апаратурна схема виробництва - 2 аркуші А1.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5. Автоматизація	Клименко О.М., доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління		

7. Дата видачі завдання 01 квітня 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика готової вакцини	01.04.21-05.04.21	
2	Обґрунтування вибору штаму та характеристика <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	06.04.21-11.04.21	
3	Техніко-економічне обґрунтування	12.04.21-17.04.21	
4	Біосинтез цільового продукту	18.04.21-23.04.21	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми	24.04.21-29.04.21	
6	Специфікація обладнання	30.04.21-05.05.21	
7	Опис технологічної схеми	6.05.21-11.05.21	
8	Контроль виробництва	12.05.21-17.05.21	
9	Автоматизація ділянки виробництва	18.05.21-23.05.21	
10	Охорона довкілля	23.05.21-25.05.21	
11	Оформлення пояснювальної записки	25.05.21-28.05.21	
12	Виконання графічної частини	01.04.21-28.05.21	

Здобувач

Нагорна А.В.

(підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

Керівник роботи Стабніков В.П.

(підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Представлено кваліфікаційну роботу виробництва субстанції ергостерину у вигляді сухих кристалів культивуванням рекомбінантного штаму штаму *Neisseria gonorrhoeae* CDC-F62, який синтезує на середовищі GCB. Вакцинація — один із ефективних методів профілактики інфекційних хвороб, дієвість якого підтверджена часом. Технологія виробництва субстанції складається з допоміжних робіт (приготування мийних засобів, підготовка стисненого аераційного повітря, приготування та стерилізація поживного середовища, піногасника, розчину натрій хлориду, розчину фенолу, підготовка ампул) та основних процесів (вирощування інокуляту в колбах на качалці, виробничого біосинтезу, центрифугування культуральної рідини, інактивація, стандартизація, ампулювання), що наведені в технологічній та апаратурній схемах.

Дипломний проект викладений на 122 стор. друкованого тексту, містить 15 таблиць, 9 рисунків і складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (86 джерел) та графічної частини (4 креслень формату А1).

Ключові слова: вакцина гонококова, *Neisseria gonorrhoeae* CDC-F62, виділення біомаси, інактивація, стандартизація, ампулювання.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	2
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1.ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОЇ ВАКЦИНИ.....	8
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКИ <i>NE SERIA GONORRHOEA</i>	12
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	27
3.1 Потреба у цільовому продукті.	27
3.2 Розрахунок потужності виробництва	30
3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера	31
3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	32
РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	34
4.1.Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	34
4.2 Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт	36
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	39
5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного, вентиляційного та стисненого повітря.....	43
5.1.3.Обґрунтування вибору мийних та дезінфікувальних засобів	44
5.1.4. Обґрунтування особливостей приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту та виробничого біосинтезу	47
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту	50
5.3.Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту.....	52
5.3.1. Обґрунтування вибору способу приготування кінцевої форми продукту.....	52
5.3.2 Обґрунтування вибору та підготовки первинної упаковки.....	53
5.3.3 Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень	54
5.3.4 Обґрунтування вибору підготовки води	55
5.4. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	56
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНЯННЯ.....	60
РОЗДІЛ 7.ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	68
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	85
8.1. Мікробіологічний контроль	85
8.1.1 Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища.....	86
8.1.2 Мікробіологічний контроль чистоти виробничої культури <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (посівного матеріалу).....	86
8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	87
8.2.1. Визначення біомаси	87
8.2.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту	88

8.2.3. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів	89
8.3. Показники якості готового продукту	93
РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА	99
РОЗДІЛ 10 ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	106
10.1 Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів	106
10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва	108
10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів	108
10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів	110
10.2.3. Система знешкодження та утилізації готової продукції	110

ВСТУП

Вакцинація — один із ефективних методів профілактики інфекційних хвороб, дієвість якого підтверджена часом. За останні сто років у сфері вакцинації, як і в інших галузях медицини, сталися значні зміни. В імунопрофілактики початку ХХІ ст. такі ж відмінності від імунопрофілактики початку ХХ ст., як і, наприклад, у хірургії, анестезіології, що зазнавали змін в інтервалі 100 років. Зміни в імунопрофілактиці стосувалися розширення спектра захворювань, яким можна запобігти, моніторингу за безпечністю та контролю якості вакцин, а також технологій їх виробництва. Зміни в технологіях виробництва вакцин пов'язані з необхідністю отримання антигенного матеріалу для проведення щеплень, забезпечення вищого рівня безпеки [1].

Уже понад 200 років минуло з моменту винаходу вакцинації, і сьогодні ця ефективна методика профілактики захворювань є, без перебільшення, основою людської цивілізації.

Споглядаючи минуле імунопрофілактики, ми повинні констатувати та розуміти, що з науково-технічним прогресом змінювалися й самі вакцини: склад вакцин, технології їх виробництва. Хоча, дійсно, положення вакцинології, закладені трохи більше 100 років тому, і сьогодні залишаються тією ж основою, на якій ґрунтуються принципи вакцинації [1].

Розробка вакцини проти *N. Gonorrhoeae* хоч і була проблематичною але останнім часом прогрес в цій галузі дає нову надію, що ефективна гонококова вакцина бути створена.

З часу першого введення антибіотиків для лікування гонореї в середині 1930-х років бактерія продемонструвала неабияку здатність розвивати резистентність до антибіотиків за допомогою різних механізмів, завдяки природній компетентності в обміні ДНК.

					НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Нагорна			ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркуші
Консульт.							6	122
Керівник		Стабніков						
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог						

Деякі країни повідомляють про випадки гонореї, стійкої до всіх відомих антибіотиків [2].

Бактерія має численні фактори вірулентності, які допомагають їй примикати до епітеліальних клітин господаря, а також ухиляються від імунної відповіді господаря через його високо мінливі поверхневі антигени.

Недоліковане або недіагностоване інфікування *N. gonorrhoeae* і може призвести до серйозних наслідків. Таким чином, при оціненій захворюваності понад 106 мільйонів випадків на рік, *N. gonorrhoeae* є глобальною проблемою охорони здоров'я.

Швидке, глобальне виникнення багаторезистентних гонококових штамів підняли занепокоєння, що невиліковна форма *N. gonorrhoeae* може незабаром набути широкого поширення. Як результат, інтерес до дослідження вакцини суттєво збільшився [3].

Актуальність:

У міру зростання стійкості до антибіотиків розробка вакцини проти *N. gonorrhoeae* стає все більш загальною задачею. Створення ефективної гонококової вакцини, має важливе значення для людства на сьогоднішній день, можливість її широкого застосування в медицині зможе вберегти здоров'я мільйонів людей. Це має потенціал для активізації досліджень у галузі розробки вакцини проти гонококів та буде направляти подальші дослідження антигенів та механізмів, необхідних для захисту від гонококової інфекції.

РОЗДІЛ 1.ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОЇ ВАКЦИНИ

Вакцина гонококова інактивована (*Gonococcal vaccine inactivated*) – препарат являє собою суспензію інактивованої культури гонококів в 0,9% розчині натрію хлориду. Підвищує специфічну реактивність організму. Використовують з метою діагностики і як допоміжний метод лікування гонорейних інфекції з трирічного віку [4].

Станом на сьогоднішній день, гонококова вакцина не виробляється в Україні та не представлена на ринку. До недавнього часу єдиним виробником гонококової вакцини в Україні була компанія ПАТ “Фармстандарт – Біолек” м. Харків (рис. 1.1) але на даний момент термін реєстрації препарату закінчився [5].



Рис. 1.1. Вакцина гонококова виробництва ПАТ “Фармстандарт–Біолек” м. Харків

Форма випуску, упаковка і склад препарату:

Вакцина гонококова інактивована (гоновакцина), суспензія для внутрішньо-м’язового введення, в ампулах об’ємом 1 мл (рис.1.2), жовтувато-сірого кольору, з осадом, що легко розчиняється при струшуванні, без сторонніх видимих включень [4].

					НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ								
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОЇ ВАКЦИН								
Розробив		Нагорна								Літ.	Арк.	Аркушів	
Консульт.											8	122	
Керівник		Стабніков											
Н. Контр.													
Затверд.		Пирог											



Рис. 1.2 Вакцина гонококова інактивована, виробник «МІКРО – ГЕН» Росія.

Склад: 1 мл препарату містить: Активна речовина: суспензія інактивованої культури гонококів – 10МЕ (одиниць стандартного зразка каламутності). Допоміжні речовини: фенол - консервант (2,5 мг), натрію хлорид (9 мг) і вода для ін'єкцій (до 1 мл).

Клініко-фармакологічна група:

Вакцина для лікування і діагностики гонореї

Фармако-терапевтична група:

МІБП-вакцина для ін'єкцій до 1 мл.

Фармакологічна дія

Підвищує специфічну реактивність організму (стимулює вироблення антитіл з нейтралізуючою і захисною дією).

Режим дозування:

Вакцину вводять внутрішньо м'язово. Введений препарат повинен мати температуру тіла.

Перед набором в шприц ампулу з вакциною необхідно струсити для отримання однорідної суспензії. Препарат в розкритій ампулі зберіганню не підлягає.

При гонорейній інфекції:

Дорослим ін'єкції проводять з інтервалом 1 – 2 діб в залежності від реакції. Початкова доза вакцини становить 0,3 – 0,4 мл (при ускладненій гонореї застосування вакцини слід починати з 0,2 – 0,3 мл). При температурі

не більше 36,9 ° С доза вакцини кожен раз збільшується на 0,3 мл, інтервал введення становить 1 добу.

При підвищенні температури (менше, ніж на 1,5 ° С від нормальної) доза вакцини кожен раз збільшується на 0,15 мл, інтервал введення становить 2 доби. Максимальна разова доза вакцини не повинна перевищувати 2,0 мл. Вакцину вводять 1 раз / день. Тривалість лікування до 6 – 8 ін'єкцій.

Показання до застосування:

Застосування вакцини гонококової показано хворим після безуспішної антибіотик терапії при мляво протікаючих рецидивах, при гострих і хронічних формах захворювання, чоловікам з ускладненою гонореею і жінкам з висхідною гонореею (після стихання гострих запальних явищ), в гінекологічній практиці при лікуванні запальних процесів [6].

У дорослих:

- гонорейна інфекція (у складі комплексної терапії) після безуспішної антибіотик терапії і хронічних формах захворювання.
- діагностика гонореї (обстеження на гонорею хворих з хронічними захворюваннями сечостатевих органів, встановлення вилікування гонореї).

У дітей з 3-річного віку:

- гонорейна інфекція (у складі комплексної терапії)
- діагностика гонореї (обстеження на гонорею хворих з хронічними захворюваннями сечостатевих органів)

При діагностиці гонореї:

Для встановлення виліковності гонореї, а також при обстеженні на гонорею хворих з хронічними захворюваннями сечостатевих органів в якості провокацій вводять 0,5 мл вакцини. Якщо вакцина застосовувалась під час лікування, то для провокації призначається подвійна остання терапевтична доза, але не більше 2,0 мл.

Побічні дії:

Загальна реакція проявляється нездужанням, підвищенням температури тіла до 39,0 ° С протягом 24 – 48 годин з моменту введення вакцини, головним болем, загальною слабкістю; вогнищева – посиленням виділень, хворобливістю в уражених органах, помутнінням сечі; місцева – хворобливістю в області ін'єкції [7].

Протипоказання до застосування:

Застосування вакцини протипоказано при:

- гіперчутливості до складових компонентів препарату гепатиті С; захворюваннях системи кровообігу (хронічної ішемічної хвороби серця, атеросклерозі);
- важких імунодефіцитних станах (включаючи ВІЛ-інфекції);
- захворювання сечостатевої системи (хронічна ниркова недостатність, гостра ниркова недостатність, гломерулонефрит);
- менструація;

Умови зберігання

Зберігати препарат Вакцина Гонококова необхідно в холодильнику при температурі від + 2 ° С до + 8 ° С, в оригінальній упаковці, в місці без доступу дітям. Не можна заморожувати.

Термін придатності 12 місяців.

Особливі вказівки:

Не придатний до застосування препарат в ампулах з порушеною цілісністю або маркуванням, при зміні фізичних властивостей (зміна кольору, наявність не розбивається при струшуванні осаду), при наявності сторонніх включень, порушення умов зберігання.[8]

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ШТАМУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКИ *NESERIA GONORRHOEA*

Neisseria gonorrhoeae. – нерухомий грамнегативний диплокок, обидві половинки якого мають схожість з кавовими зернами, зверненими увігнутою стороною один до одного. Фагоцитовані нейтрофілами гонококи частіше не гинуть, а зберігають життєздатність і вірулентність (ендоцитобіоз) і навіть розмножуються.

У несприятливих умовах, зокрема під впливом антибактеріальних препаратів, гонококи можуть трансформуватися в L –форму або змінювати свої властивості.

Гонококи вибагливі, тому як правило, вирощуються в багатих поживних середовищах.

Neisseria gonorrhoeae важко культивується в рідких середовищах. В даний час представлена мала кількість рідких середовищ, визначеного або невизначеного складу, які б дозволяли надійно культивувати цю бактерію із низької концентрації інокуляту. Стандартні поживні середовища допускають розмноження деяких штамів *N. gonorrhoeae* з великої дози інокуляту, але такі середовища включають інфузати, екстракти, тому їх склад є не визначеним.

Розглянемо типові приклади поживних середовищ придатних для культивування *N. gonorrhoeae* в табл.2.1

					НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Нагорна				РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКИ <i>NESERIA GONORRHOEA</i>	Літ.	Арк.	Аркуші
Консульт.							12	122
Керівник	Стабніков							
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог							

Порівняльна характеристика поживних середовищ використовуваних для культивування *Neisseria gonorrhoeae*

Продуцент	Склад поживного середовища г/л	Умови культивуван ня	Конц. біомаси г/л	Особлив сті процесу біосинтезу	Література
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> NCTC 8375	Середовище GW глюкоза 20.0 гідрокарбонат амонію 4.0 тригідрат ацетату натрію 2.0 L-глутамін 1.5 спермідин 0.4 L-аргінін 0.2 Гіпоксантин 0.1 урацил 0.1 оксалоацетат 0.1 тіамін гідрохлорид 0.1 L-орнітин 0.02 нікотинамід-аденінуноклеотид 0.02 DL-лактат натрію 2,5 мл 60% розчин.	Температура 37°C Час культивування 24 год рН 6.8	7	Культив ування проводили при 37°C. При постійному перемішуванні та аерації	Jeremy James Wade, Michelle Angela Graver. A fully defined, clear and protein-free liquid medium permitting dense growth of <i>Neisseria gonorrhoeae</i> from very low inocula. FEMS Microbiology Letters, 7 June 2007 273(1),35–37. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00776.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC49226	Середовище FB Глюкоза 5.0 Дріжджовий автолізат 5.0 Неопептон 2.0 Агароза 0.75 Гематин 0.03	Температура 37°C Час культивування 24 год рН 7,0	2	Культивування проводили при 37°C. При постійному перемішуванні та аерації	Takei M, Yamaguchi Y, Fukuda H, Yasuda M, Deguchi T. Cultivation of <i>Neisseria gonorrhoeae</i> in liquid media and determination of its in vitro susceptibilities to quinolones. J Clin Microbiol. 2005. Sep;43(9):4321-7 doi: 10.1128 /

	НАД 0.0015				JCM.43.9.4321-4327.2005
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> CDC-F62	Середовище GCB Манітол 20 Триптон 10 Порошок `Lab-Lemco` 10 Екстракт дріжджів 5.0 Хлорид літію 5.0 Хлористий натрій 5.0 Гліцин 1.3 Піруват натрію 3.0	Температура 37 °C Час культивування 24 годин pH 6,9	8	Культивування проводять при постійному перемішуванні та аерації.	Rikhav P. Gala ¹ , Rokon U, Martin J. D.Souza M. Zughair. Novel Whole-Cell Inactivated Neisseria Gonorrhoeae Microparticles as Vaccine Formulation in Intracutaneous Transdermal Immunization. Vaccines 2018, 6, 60;doi:10.3390/vaccines6030060

Дані, наведені у табл. 2.1, свідчать, про однакову тривалість культивування штамів *Neisseria gonorrhoeae* NCTC 8375, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC49226, *Neisseria gonorrhoeae* CDC-F62, проте те склад поживних середовищ і вихід біомаси є різним. Тому на наступному етапі вибору біологічного агенту розрахуємо вартість поживних середовищ для культивування вибраних мікроорганізмів (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Порівняльна характеристика вартості компонентів поживних середовищ для культивування *Neisseria gonorrhoeae*

Біологічний агент	Компонент середовища г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Література
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> NCTC 8375 Середовище GW	глюкоза 20.0	50	1	[1,2,3,5,6,7]
	гідрокарбонат амонію 4.0	14	0,056	
	тригідрат ацетату натрію 2.0	46	0,092	
	L-глютамін 1.5	576,45	0,86	
	Спермідин 0.4	4040	1,62	
	L-аргінін 0.2	550	0,11	
	Гіпоксантин 0.1	150680	15	
	урацил 0.1	25821.30	2,6	
	оксалоацетат 0.1	383676,50	38,4	
	тіамін гідрохлорид 0.1	25252	2,5	
	L-орнітин 0.02	8080,65	0,16	
	нікотинамід- аденінудинуклеотид 0.02	43096	0,86	
DL-лактат натрію 2,5 мл 60% розчин.	12458,25	31,14		
Вартість 1 л середовища –			94,5 грн	
<i>Neisseia gonorrhoeae</i>	Глюкоза 5.0	50	0,15	

ATCC49226 Середовище FB	Дріжджовий автолізат 5.0	1632	8,16	[1,2,3,4,5,6,7]
	Неопептон 2.0	6530	13,06	
	Агароза 0.75	5387,50	4,04	
	Гематин 0.03	2158,80	0,064	
	НАД 0.0015	43096	0,06	
Вартість 1 л середовища – 25,5 грн				
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> CDC-F62 Середовище GCB	Манітол 20	950	19	[1,2,3,4,5,6,7]
	Триптон 10	2980	29,8	
	М'ясний екстракт 10	1985	19,85	
	Дріжджовий автолізат 5.0	1632	8,16	
	Хлорид літію 5.0	942	4,17	
	Хлорид натрію 5.0	30	0,15	
	Гліцин 1.3	225	0,3	
	Піруват натрію 3.0	2693	8,07	
Вартість 1 л середовища – 89,5 грн				

Примітка 1.1 Ціни наведено станом на 2020 рік станом на 21 лютого.

Ціни переведені в гривню відповідно до курсу станом на 2020 рік.

1.<https://prom.ua>, 2.<https://www.srlchem.com>, 3.<https://russian.alibaba.com>, 4.<https://www.sigmaaldrich.com>, 5.<http://agar.com.ua>, 6.<https://www.thomasci.com>, 7.<http://www.laboratorii.com>.

2.2 Розрахунок біомаси

Під час культивування штамів бактерій *Neisseria gonorrhoeae* як показник процесу наводиться концентрація живих клітин (колонійутворювальні одиниці, КУО/мл). У цьому разі концентрація біомаси зазвичай становить 6–8 г/л. Отже, необхідно приблизно визначити концентрацію біомаси за складом поживного середовища (за концентрацією азоту, зокрема).[9]

Розрахуємо теоретично можливий вихід біомаси за азотом в середовищі GW.

Основним джерелом азоту в середовищі GW виступає гідрокарбонат амонію, що міститься в середовищі в кількості 4 г/л. Розрахуємо теоретично можливий вихід біомаси за азотом.

Вміст азоту в біомасі бактерій становить 10–14 % від маси сухої речовини. Для визначення рівня біомаси, якого можна досягнути при культивуванні бактерій на середовищі з 4г/л гідрокарбонату амонію, потрібно спочатку розрахувати вміст елементарного азоту в даній солі. Визначаємо кількість елементарного азоту в 4 г/л гідрокарбонату амонію. Для цього розрахуємо молярну масу гідрокарбонату амонію: молярна маса гідрокарбонату амонію 79г/моль. Визначимо кількість азоту (в грамах), що знаходиться в гідрокарбонаті амонію: із 79 г сполуки на азот припадає 14г (так як за формулою в заданій речовині міститься 1 атом нітрогену, а атомна маса одного нітрогену = 14 г).

За отриманими даними ми можемо скласти пропорцію і визначити кількість нітрогену в 4 г гідрокарбонаті амонію:



$$X = \frac{14 \times 4}{79} = 0,7$$

Так як у біомасі міститься 10% азоту, то з 0,7г N за пропорцією можна визначити теоретично можливий рівень біомаси:

$$0,7\text{г/л} - 10 \%$$

$$Y \text{ г/л} - 100 \%$$

$$Y = \frac{0,7 \times 100}{10} = 7$$

Звідси 7 г/л біомаси. Теоретично можливий рівень біомаси за азотом через гідрокарбонатамонію амонію становить 7 г/л.

Розрахуємо теоретично можливий вихід біомаси за вуглецем для GW середовища

Для початку потрібно встановити кількість елементарного вуглецю в 20 г/л глюкози. Для цього розрахуємо молярну масу глюкози: молярна маса глюкози ($C_6H_{12}O_6$) = 180 г/моль. Далі необхідно визначити кількість карбону що припадає на 180 г глюкози: із 180 г глюкози на карбон припадає 72 г (так як згідно формулі в глюкозі міститься 6 атомів карбону, а атомна маса одного карбону = 12 г, тому $6 \times 12 = 72$ г).

Отже, за отриманими даними ми можемо скласти пропорцію і дізнатися кількість карбону в 20 грамах глюкози:

$$180 \text{ г } C_6H_{12}O_6 - 72 \text{ г } C$$

$$20 \text{ г } C_6H_{12}O_6 - X \text{ г } C,$$

Звідки, $X = \frac{72 \times 20}{180} = 8$ г (вміст карбону в 20 г глюкози), також це число

можна вважати як теоретично можливий рівень біомаси, це пояснюється тим що, клітини у процесі свого росту використовують половину вуглецю на синтез АТФ (утворення енергії), а інша половина (тобто 4 г) припадає на утворення біомаси, але так як у біомасі 50% становить вуглець, то за пропорцією:

$$4 \text{ г/л} - 50 \%$$

$$Y \text{ г/л} - 100 \%$$

Звідси $Y = \frac{4 \times 100}{50} = 8$ г/л біомаси. Отже, теоретично можливий рівень

біомаси за вуглецем в глюкозі = 8 г/л.

Отже, лімітуючим фактором в середовищі GW виступає вміст нітрогену в середовищі, з цього можна зробити висновок що концентрація біомаси бактерій *Neisseria gonorrhoeae* NCTC культивованих в середовищі GW становитиме 7г/л.

Розрахуємо теоретично можливий вихід біомаси за азотом для FB середовища

Одним із джерел азоту в середовищі FB виступає дріжджовий автолізат в кількості 5 г/л. Відомо, що загальний вміст нітрогену в дріжджовому автолізаті становить близько 7%, тому розрахуємо вміст нітрогену в 5 г дріжджового автолізату: складаємо пропорцію, оскільки вміст нітрогену в дріжджовому автолізаті 7%, отже в 100г автолізату міститься 7г нітрогену, а в 5г – X г

$$100 \text{ г} - 7\text{г}$$

$$5 \text{ г} - X \text{ г}$$

$$\text{Звідси, } X = (5 \cdot 7) / 100 = 0,35 \text{ г Нітрогену}$$

Так як у біомасі міститься 10% азоту, то з 0,35г N за пропорцією можна визначити теоретично можливий рівень біомаси:

$$0,35\text{г/л} - 10 \%$$

$$Y \text{ г/л} - 100 \%$$

$$Y = \frac{0,35 \times 100}{10} = 3,5$$

Звідси 3.5 г/л біомаси. Теоретично можливий рівень біомаси за азотом через дріжджовий автолізат становить 3.5 г/л.

Ще одним джерелом Нітрогену в даному середовищі є неопептон в кількості 2 г/л. Загальний вміст Нітрогену в неопептоні становить 16.4 % тому розрахуємо вміст нітрогену в 2 г неопептону: складаємо пропорцію, оскільки вміст нітрогену в неопептоні 16.4 %, отже в 100г неопептону міститься 16.4 г нітрогену, а в 2г – X г

$$100 \text{ г} - 16,4\text{г}$$

$$2 \text{ г} - X \text{ г}$$

$$\text{Звідси, } X = (2 \cdot 16,4) / 100 = 0,33 \text{ г Нітрогену}$$

Так як у біомасі міститься 10% азоту, то з 0,33г N за пропорцією можна визначити теоретично можливий рівень біомаси:

$$0,33\text{г/л} - 10 \%$$

$$Y \text{ г/л} - 100 \%$$

$$Y = \frac{0,33 \times 100}{10} = 3.3$$

Звідси 3.3 г/л біомаси. Теоретично можливий рівень біомаси за азотом через неопептон становить 3.3 г/л.

Отже, розрахувавши теоретичний рівень біомаси за двома джерелами Нітрогену в середовищі, можна зробити висновок, що теоретичний вихід біомаси за джерелом азоту в середовищі FB становитиме (3.5 г/л за дріждж. автолізатом + 3.3 г/л за неопептоном) = 6.8 г/л.

Розрахуємо теоретично можливий вихід біомаси за вуглецем

Розраховуємо кількість вуглецю в 5 г/л глюкози. Молярна маса глюкози ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) = 180 г/моль. Далі необхідно визначити кількість карбону що припадає на 180 г глюкози: із 180 г глюкози на карбон припадає 72 г (так як згідно формулі в глюкозі міститься 6 атомів карбону, а атомна маса одного карбону = 12 г, тому $6 \times 12 = 72$ г).

Отже, за отриманими даними ми можемо скласти пропорцію і дізнатися кількість карбону в 20 грамах глюкози:

$$180 \text{ г } \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - 72 \text{ г } \text{C}$$

$$5 \text{ г } \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - X \text{ г } \text{C},$$

$$\text{Звідки, } X = \frac{72 \times 5}{180} = 2 \text{ г (вміст карбону в 5 г глюкози), також це число}$$

можна вважати як теоретично можливий рівень біомаси, це пояснюється тим що, клітини у процесі свого росту використовують половину вуглецю на синтез АТФ (утворення енергії), а інша половина (тобто 1 г) припадає на утворення біомаси, але так як у біомасі 50% становить вуглець, то за пропорцією:

$$1 \text{ г/л} - 50 \%$$

$$Y \text{ г/л} - 100 \%$$

Звідси $Y = \frac{1 \times 100}{50} = 2 \text{ г/л}$ біомаси. Отже, теоретично можливий рівень

біомаси за вуглецем в глюкозі = 2 г/л.

Отже, лімітуючим фактором в середовищі FВ виступає вміст вуглецю в середовищі, з цього можна зробити висновок що концентрація біомаси бактерій *Neisseria gonorrhoeae ATCC49226* культивованих в середовищі FВ становитиме 2 г/л.

Розрахуємо теоретично можливий вихід біомаси за азотом для GCB середовища

Основним джерелом азоту в середовищі GCB виступає триптон, що міститься в середовищі в кількості 10 г/л. Розрахуємо теоретично можливий вихід біомаси за азотом. Загальний вміст Нітрогену в якому становить 13% тому розрахуємо вміст нітрогену в 10 г триптону: складаємо пропорцію, оскільки вміст нітрогену в триптоні 13 %, отже в 100г міститься 13г Нітрогену, а в 10г – X г

$$100 \text{ г} - 13 \text{ г}$$

$$10 \text{ г} - X \text{ г}$$

$$\text{Звідси, } X = (10 \cdot 13) / 100 = 1.3 \text{ г Нітрогену}$$

Так як у біомасі міститься 10% азоту, то з 1.3 г N за пропорцією можна визначити теоретично можливий рівень біомаси:

$$1.3 \text{ г/л} - 10 \%$$

$$Y \text{ г/л} - 100 \%$$

$$Y = \frac{1.3 \times 100}{10} = 13 \text{ г/л}$$

Звідси 13 г/л біомаси. Теоретично можливий рівень біомаси за азотом через є триптон становить 13 г/л.

Розрахуємо теоретично можливий вихід біомаси за вуглецем для GCB середовища

Для початку потрібно встановити кількість елементарного вуглецю в

20 г/л манітолу. Для цього розрахуємо молярну масу манітолу: молярна маса манітолу ($C_6H_{14}O_6$) = 182 г/моль. Далі необхідно визначити кількість карбону що припадає на 182 г манітолу: із 180 г манітолу на карбон припадає 72 г (так як згідно формули міститься 6 атомів карбону, а атомна маса одного карбону = 12 г, тому $6 \times 12 = 72$ г).

Отже, за отриманими даними ми можемо скласти пропорцію і дізнатися кількість карбону в 20 грамах манітолу:

$$180 \text{ г } C_6H_{14}O_6 - 72 \text{ г } C$$

$$20 \text{ г } C_6H_{14}O_6 - X \text{ г } C,$$

Звідки, $X = \frac{72 \times 20}{180} = 8$ г (вміст карбону в 20 г манітолу), також це

число можна вважати як теоретично можливий рівень біомаси, це пояснюється тим що, клітини у процесі свого росту використовують половину вуглецю на синтез АТФ (утворення енергії), а інша половина (тобто 4 г) припадає на утворення біомаси, але так як у біомасі 50% становить вуглець, то за пропорцією:

$$4 \text{ г/л} - 50 \%$$

$$Y \text{ г/л} - 100 \%$$

Звідси $Y = \frac{4 \times 100}{50} = 8$ г/л біомаси. Отже, теоретично можливий рівень

біомаси за вуглецем = 8 г/л.

Отже, лімітуючим фактором в середовищі GCB виступає вміст вуглецю в середовищі, з цього можна зробити висновок що концентрація біомаси бактерій *Neisseria gonorrhoeae* CDC-F62 культивованих в середовищі GCB становитиме 8 г/л.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г/л цільового продукту при культивуванні штамів

***Neisseria gonorrhoeae* NCTC 8375, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC49226,**

Neisseria gonorrhoeae CDC-F62

Біологічний агент	Вартість 1л середовища, грн	Кількість цільового продукту, г/л	Умовна вартість 1 г/л цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість цільового продукту за годину, г/год
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> NCTC 8375 Середовище GW	94,5	7	13,5	24	0.29
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC49226 Середовище FB	25,5	2	12,75	24	0,083
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> CDC-F62 Середовище GCB	89,5	8	11,8	24	0,33

Штам *Neisseria gonorrhoeae* NCTC 8375 культивований на середовищі GW використовує синтетичне середовище, визначеного складу. Незважаючи на порівняно високий вихід біомаси та кількості цільового продукту за годину, середовище GW має ряд суттєвих недоліків, а саме: висока вартість 1 л поживного середовища – 94.5, складність у приготуванні та стерелізації, тому можна зробити висновок, що використання даного штаму є економічно не вигідним.

Штам *Neisseria gonorrhoeae* ATCC49226 культивований на середовищі FB має порівняно нижчу вартість 1 л поживного середовища, проте вихід біомаси та кількості цільового продукту за годину менший в порівнянні з середовищем GCB.

Згідно даних таблиці, рівень біомаси штам *Neisseria gonorrhoeae* CDC-F62 на середовищі GCB становить 8 г/л . Відносно не дороге напівсинтетичне середовище, є досить простим у приготуванні, в порівнянні з середовищем GW. Дане середовище дає порівняно високу кількість цільового продукту на годину – 0,33г/год, високий вихід біомаси та помірна вартість за 1 л, простота

приготування та стерилізації роблять дане середовище найбільш перспективним для одержання біомаси *Neisseria gonorrhoeae*.

2.3. Морфолого-культуральні ознаки

Neisseria gonorrhoeae – бактерія овальної або кулястої форми (кока) з сусідньою стороною увігнутою, розмір бактерії становить близько 0,6 – 1,0 мкм (мікромметр) в діаметрі. *Neisseria gonorrhoeae* розташовані поодинокі або парами, з сусідньою стороною увігнутою, і вони зазвичай присутні внутрішньоклітинно при безпосередньому мікроскопіюванні дослідженні зразка з зони ураження. На рис. 2.1 зображено мікроскопіювання досліджуваних зразків з зони ураження *Neisseria gonorrhoeae*.

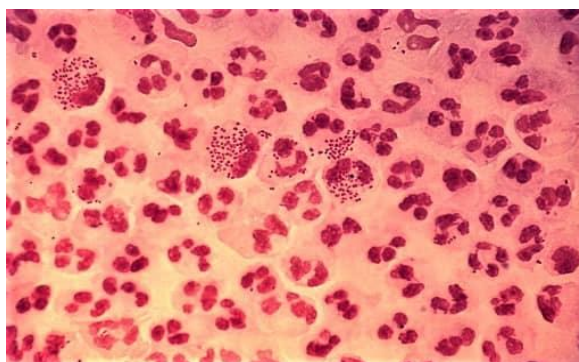


Рис 2.1. *Neisseria gonorrhoeae*

Neisseria gonorrhoeae – це нерухлива бактерія. Бактерія не має джгутиків, можуть бути присутні фімбрії, неспороутворююча бактерія.

Це капсульована бактерія, капсула охоплює кожну пару коків. [10] Капсули можна легко продемонструвати, використовуючи підфарбований препарат, виглядають вони як прозорі включення на темному тлі. Більше того, наявність капсули залежить від походження зразка, оскільки зразок, взятий у носія, може містити або не містити капсульовану *N. gonorrhoeae*, тоді як зразок, виділений з уретрального або вагінального виділення або з крові, зазвичай містить капсульовану форму *N. gonorrhoeae*. *Neisseria gonorrhoeae* – це грам-негативна бактерія [10].

Фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.

N. gonorrhoeae – факультативний аероб, тобто може рости як за наявності, так і за відсутності кисню. Оптимальною температурою росту – є 35 – 36 ° С. Оптимальний рН становить від 5,8 до 8,0, але максимальний приріст в лабораторних умовах спостерігається на рівні 7,0 - 7,2.

Колонії – це прозорі диски приблизно шпильковими, дискретними, круглими краями.

Біохімічно вони позитивні до оксидази, ферментують глюкозу, не здатні до ферментації мальтози.

Вони гинуть при 55 °С за 5 хвилин, крихкі і не можуть протистояти несприятливим умовам [11].

Колонії *N. gonorrhoeae* рожево-бурі. Чітка золотисто-коричнева пігментація виявляється після інкубації протягом 48 год. культури є результатом аутолізу клітин [11]. На рис 3.2 зображено пігментацію культури *N. gonorrhoeae*.



Рис 2.2. Пігментація колоній *N. gonorrhoeae*

Культивувати в лабораторних умовах досить важко, оскільки *Neisseria gonorrhoeae* має складні харчові вимоги тому вирощуються в середовищах, що містять кров або сироватку, зазвичай це середовище кров'яного агару, середовище шоколадного агару.

2.4 Таксономічний статус біологічного агента.

Сучасна (філогенетична) класифікація для *N. gonorrhoeae* наведена згідно другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [12].

Домен – *Bacteria*

Тип – *Proteobacteria*

Клас – *Betaproteobacteria*

Родина – *Neisseriaceae*

Рід – *Neisseria*

Вид – *Neisseria gonorrhoeae*

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

3.1 Потреба у цільовому продукті.

Інфекції, що передаються статевим шляхом (ІПСШ) – національна проблема охорони здоров'я України. За даними МОЗ в Україні щорічно реєструється близько 400 тисяч нових випадків сифілісу, гонореї, хламідіозу, герпесу, сечостатевого мікоплазмозу, генітального кандидозу та трихомонозу.

За оцінками ВООЗ, у світі, приблизно 78 мільйонів нових випадків гонореї трапляються щорічно, половина з яких - у країнах з низьким та середнім рівнем доходу. Нелікована інфекція може призвести до ускладнень, таких як тазові запальні захворювання, безпліддя та позаматкова вагітність у жінок, уретрит та безпліддя у чоловіків. Гонорея також збільшує ризик набуття та передачі ВІЛ [13].

Питання виготовлення гонококової вакцини Україні на сьогоднішній день є однією з найбільш актуальних проблем.

Кінцевою метою розробки вакцини є запобігання захворюванню та / або зараженню у групі щеплених осіб, сподіваємось, що комплексна програма вакцин запобіжить передачі та врешті знищить хворобу серед населення.

Потреба населення України у вакцині для профілактики гонореї

Гонорея є однією з найбільш розповсюджених інфекції, що передаються статевим шляхом. За результатами численних досліджень встановлено, що наявність ІПСШ суттєво підвищує ризик передачі та інфікування ВІЛ статевим шляхом[14]

					НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушіє</i>
<i>Розробив</i>	<i>Нагорна</i>						27	122
<i>Консульт.</i>								
<i>Керівник</i>	<i>Стабніков</i>							
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Пирог</i>							

Таблиця 3.1

**Вихідні дані для розрахунку річної потреби у гонококовій вакцині
для населення України, згідно статистичних даних станом на 2017 рік**

Регіон (область)	Кількість хворих
Вінницька	84
Волинська	59
Дніпропетровська	1381
Донецька	229
Житомирська	121
Закарпатська	75
Запорізька	72
Івано-Франківська	177
Київська	41
Кіровоградська	239
Луганська	39
Львівська	106
Миколаївська	126
Одеська	278
Полтавська	68
Рівненська	77
Сумська	132
Тернопільська	93
Харківська	448
Херсонська	226
Хмельницька	226
Черкаська	65
Чернівецька	109
Чернігівська	158
м.Київ	150
Всього	4779

* **Примітка:** Статистичні дані що до кількості хворих в Україні наведено згідно Державної служби статистики [1] станом на 2017 рік.

Традиційним методом лікування гонореї є застосування антибіотиків.

Проте за даними з 77 країн, розвиток стійкості гонореї до антибіотиків робить лікування цього поширеного захворювання, що передається статевим шляхом, набагато більш важким, а іноді і зовсім неможливим [15].

Гонококова вакцина використовується у складі комплексної терапії у дорослих і дітей з 3-х річного віку (після безуспішної антибіотикотерапії при мляво протікають рецидивах і хронічних формах захворювання, чоловікам з ускладненою і жінкам з висхідною гонореею (після стихання гострих запальних явищ) а також для діагностики гонореї. [16]

Враховуючи те, що дана вакцина використовується в складі комплексної терапії разом з антибіотиками та призначається хворим у випадку тяжких форм захворювання та при недостатній ефективності антибіотикотерапії, тому потреба в даному препараті може бути у близько 60% хворих. Розрахуємо теоретичну кількість хворих, що матимуть потребу в даній вакцині:

$4779 \text{ хворих} * 0,4 = 1911 \text{ хворих на рік}$. Початкова доза вакцини для дорослих становить 0,3 - 0,4 мл (при ускладненій гонорееї застосування вакцини

слід починати з 0,2 - 0,3 мл).

Максимальна разова доза не повинна перевищувати 2,0 мл вакцини. Максимальна добова доза - 2,0 мл (при цьому об'єднують вміст 2-х ампул). Тривалість лікування до 6-8 ін'єкцій [16].

Дітям старше 3-х років ін'єкції проводять з інтервалом 1-2 діб в залежності від реакції. Початкова доза вакцини становить 0,05 - 0,1 мл. Максимальна разова доза - 0,5 мл вакцини. Максимальна добова доза - 0,5 мл. Тривалість лікування до 6-8 ін'єкцій [16].

Отже, для забезпечення вакциною проти гонореї населення розрахуємо кількість препарату необхідну для лікування одного дорослого хворого:

$2 \text{ мл} * 8 \text{ ін'єкцій} = 16 \text{ мл на курс лікування}$

Враховуючи те, що згідно статистичних даних [13] з загальної кількості хворих: 1911 хворих на рік – 24 хворих це діти вікової групи 14– 17 років, розрахуємо кількість препарату необхідну для лікування однієї дитини:

$0,5 \text{ мл} * 8 = 4 \text{ мл на курс лікування}$

Для забезпечення вакциною усього дорослого населення необхідно:

$1991 - 24 = 1887$ дорослих хворих на рік.

На один курс лікування для дорослого необхідно 16 мл препарату, отже для всіх дорослих хворих буде необхідно: $16 \text{ мл} * 1887 \text{ хворих на рік} = 30192$ мл.

На один курс лікування для дитини необхідно 4 мл препарату, отже розрахуємо необхідну кількість препарату для хворих дітей: $4 \text{ мл} * 24 \text{ хворих на рік} = 96 \text{ мл}$

Всього для населення України необхідно: $(30192+96) \text{ мл} = 30288 \text{ мл}$ вакцини на рік. Узагальнені дані про потребу населення України в вакцині проти гонореї наведено в табл. 3.2

Таблиця 3.2

Річна потреба населення України в вакцині гонококовій

Категорії хворих	Доза препарату	Курс вакцинації, кількість доз	Кількість хворих	Кількість препарату на річний курс вакцинації
Діти (до 18 років)	0,5 мл	6 – 8	24	96 мл
Дорослі	2 мл	6 – 8	528	30192 мл
Всього				30288 мл

3.2 Розрахунок потужності виробництва

Станом на сьогоднішній день, гонококова вакцина не виробляється в Україні та не представлена на ринку. До недавнього часу єдиним виробником гонококової вакцини в Україні була компанія ПАТ “Фармстандарт – Біолек” м. Харків але на даний момент термін реєстрації препарату закінчився [17].

Згідно з «Державним реєстром лікарських засобів України» станом на 2019–2020 рр. в Україні не зареєстровано жодного препарату гонококових вакцин. [18]

Тому Україна повинна розробити своє власне виробництво гонококової вакцини. Цьому заважають надзвичайно коштовні витрати на виробництво, недостатня кількість кваліфікованих фахівців, високі вимоги

GMP, в той час, як світовий фармацевтичний ринок вже давно дотримується таких правил.

Відповідно до АНД склад вакцини включає: 1 мл препарату в ампулі містить: активна речовина: суспензія інактивованої культури гонококів – 10МЕ (одиниць стандартного зразка каламутності), що відповідає концентрації біомаси продуцента – 8мг/мл.

Допоміжні речовини: фенол - консервант (2,5 мг), натрію хлорид (9 мг) і вода для ін'єкцій (до 1 мл).

Для приготування 30 л вакцини необхідно:

- суспензії інактивованої культури гонококів в перерахунку на АСБ,
 $30 \times 8 = 240$ г АСБ;
- фенолу $30 \times 2,5 = 75$ г;
- натрію хлориду $30 \times 9 = 270$ г
- води для ін'єкцій – $30 - (240 + 75 + 270) / 1000 = 29,415$ л

3.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Для розрахунку приймемо наступні вихідні дані:

- кількість робочих днів на рік $T_{рд} = 7$ днів;
- час циклу роботи ферментера $T_{цк} = 28$ год, де $T_{цк} = T_k + T_{пф}$
 $T_k = 24$, тривалість виробничого біосинтезу, $T_{п} = 4$ год, час підготовки ферментера до роботи);
- $K_1 = 1,1$, коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).
- $E_{св} = 9\%$ (0,09) сумарні втрати вакцини при виділенні, що включають втрати:
 - втрати при центрифугуванні - 5% (0,05)
 - втрати при термоінактивації – 5% (0,03)
 - втрати при розливі – 1% (0,01)

Розраховуємо кількість циклів

$$N = 24 \times T_{рд} / T_{цк} = 24 \cdot 7 / 28 = 6 \text{ циклів}$$

Кількість вакцини за цикл

$$V_{цк} = 30 / 6 = 5$$

Для приготування 5 л вакцини необхідно:

- суспензії інактивованої культури гонококів в перерахунку на АСБ,
 $5 \times 8 = 40$ г АСБ;
- фенолу $5 \times 2,5 = 12,5$ г;
- натрію хлориду $5 \times 9 = 45$ г
- води для ін'єкцій $5 - (40 + 12,5 + 45) / 1000 = 4,9$ л = 4900 мл

Кількість культуральної рідини за цикл

$$V_{кр} = K_1 \cdot V_{цк} / (1 - E_{св}) = 1,1 \cdot 5 / (1 - 0,09) = 6,0 \text{ л}$$

3.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{цк} = 6,0$ л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати які становлять від 10 до 15%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{роб.1} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 6,0 / (1 - 0,10) = 6,7 \text{ л ,}$$

де $E_{ф}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу. Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{роб.1} = 6,7$. При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{зап} = 0,5 - 0,65$ розраховують можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{ф}$), що становить

$$V_{ф} = V_{роб.1} / K_{зап} = 6,7 / 0,65 = 10,3 \text{ л}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 10$ л, уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{зап1} = V_{роб.1} / V_{сф} = 6,7 / 10,3 = 0,65.$$

що не набагато змінює задане значення коефіцієнті заповнення $K_{зап}$.

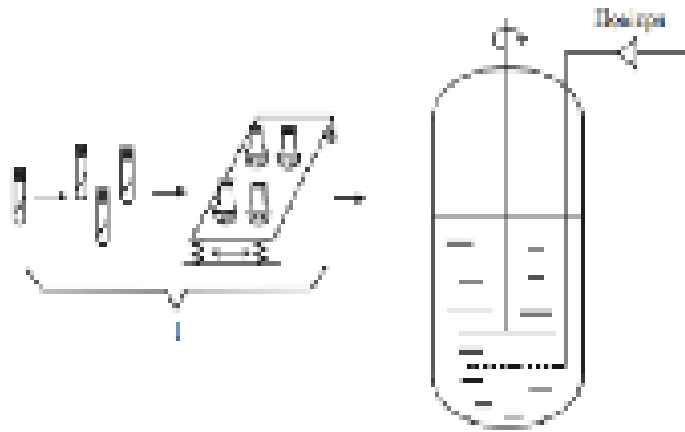


Рис.1 Схеми приготування посівного матеріалу *Neisseria gonorrhoeae* CDC-F62: 1 – вирощування в лабораторії (на скошеному агаризованому середовищі в пробірках і на рідкому поживному середовищі в колбах на качалці); 2– виробничий біосинтез 10 л .

РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

4.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Джерелом вуглецю та енергії при вирощуванні *Neisseria gonorrhoeae* є манітол.

Так як у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes відсутня інформація про шляхи катаболізму ростового субстрату у штаму *Neisseria gonorrhoeae* CDC-F62, тому для побудови шляху метаболізму глюкози обираємо серед наявних штамів один з яких *Neisseria gonorrhoeae* FA 1090 [1].

Базуючись на таких припущення та використовуючи як основу для створення катаболічного шляху манітолу катаболізм спиртів – гліколіз (шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса), що представлений у KEGG для штаму FA 109, наводимо схему перетворення манітолу (рис 1).

Манітол-фосфаттрансферазна система, основна система транспортування манітолу, каталізує фосфорилування вхідного субстрату одночасно з їх переміщенням по мембрані клітин. Ця система бере участь у транспорті D-манітолу. Манітол за участю манітол-фосфаттрансферазна системи перетворюється на манітол-1-фосфат. Де за дії манітол-1-фосфат -5-дегідрогенази перетворює манітол-1-фосфат на β -D-фруктозо-6-фосфат.

Фосфофруктокіназа (глюкокіназа) (КФ 2.7.1.11) активує перетворення β -D-фруктозо-6-фосфату у β -D-фруктозо- 1,6-фосфат. Ферментативна дія фруктозодифосфат альдолази (КФ 4.1.2.13) на β -D-фруктозо-1,6-фосфат перетворює його на гліцеральдегід 3-фосфат та діоксіацетонфосфат, який під дією тріозофосфатізомерази (КФ 5.3.1.1) перетворюється на гліцеральдегід 3-фосфат.

					НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Нагорна			РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Аркуші
Консульт.							34	122
Керівник		Стабніков						
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог						

До подальшого катаболізму глюкози залучається гліцеральдегід 3-фосфат, під дією гліцеральдегід фосфат дегідрогенази (КФ 1.2.1.12) він перетворюється на гліцерат 1,3-фосфат, що у свою чергу під дією фосфогліцераткінази (КФ 2.7.2.3) переходить у гліцерат 3-фосфат.

Дія фосфогліцератмутази (КФ 5.4.2.12) на гліцерат 3-фосфат індукує його перетворення на гліцерат 2-фосфат. Під дією енолази (КФ 4.2.1.11) гліцерат-2-фосфат переходить у фосфоенолпіруват. Кінцевою стадією перетворення є утворення пірувату з фосфоенолпірувату під дією піруваткінази (КФ 2.7.1.40).

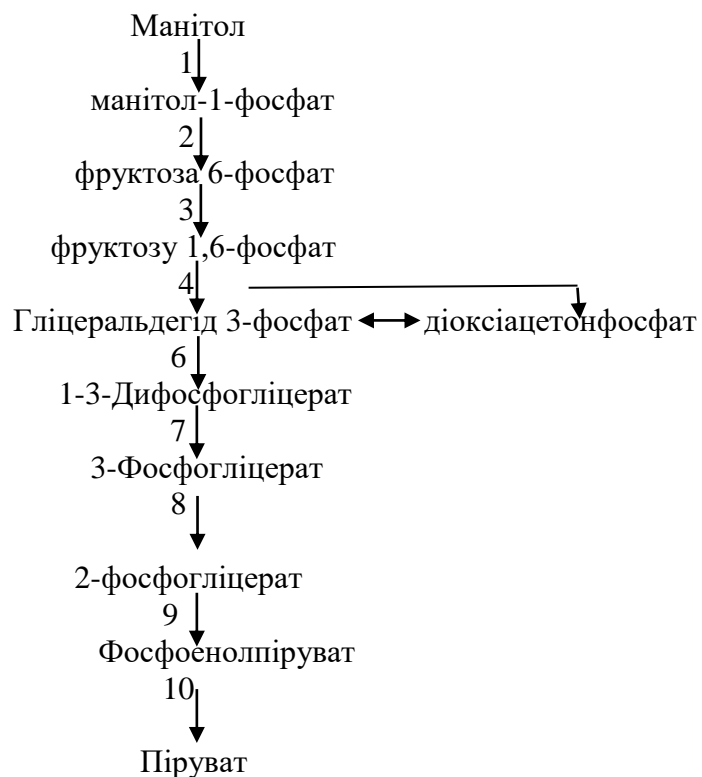


Рис 1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Ферменти: 1–манітол-фосфаттрансферазна система; 2–манітол-1-фосфат 5–дегідрогеназа;3–глюкозофосфатізомераза (КФ. 5.3.1.9);4-фосфогліцераткіназа (КФ. 2.7.1.11); 5-фруктозобіфосфатальдолаза (КФ. 4.1.2.13); 6-гліцеральдегідтрифосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 7-фосфогліцераткіназа (КФ. 2.7.2.3); 8-гліцератфосфомутаза та

фосфогліцератфосфомутаза (КФ. 5.4.2.11); 9-енолаза (КФ.4.2.1.11); 10-піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

4.2 Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Так як гонококова вакцина – це препарат на основі біомаси *Neisseria gonorrhoeae*. Біогенез препаратів на основі біомаси включає синтез основних органічних сполук, що входять до складу мікробної клітини (білків, нуклеїнових кислот, полісахаридів і ліпідів.) [20]

Всі необхідні для синтезу білків 20 амінокислот утворюються з певних метаболічних попередників. Субстратами для синтезу вуглецевого скелету амінокислот є кілька сполук – піруват, оксалоацетат, 2-оксоглутарат, 3-фосфогліцерат, фосфоенолпіруват, еритрозо-4-фосфат та 5-фосфорибозилпірофосфат. [21]

Біосинтез нуклеїнових включає в себе синтез пуринових та піримідинових нуклеїнових кислот. Синтез пуринових нуклеотидів *de novo* – це синтез їх з низькомолекулярних попередників. Субстрати для синтезу пуринових нуклеотидів: - Аспартат - Гліцин - Глутамін - ТГФК - CO₂.

Синтез пуринових нуклеотидів протікає більш складним шляхом. В результаті метаболічного шляху, який починається з 5-фосфорибозил-1-пірофосфату утворюється імідазольний нуклеотид. Три атоми піримідинового кільця, необхідні для утворення пуринового кільця з імідазольного нуклеотиду, поступають з бікарбонату, аспартату та формілтетрагідрофолієвої кислоти. Замикання кільця дає інозинмонофосфат (пуриновий нуклеотид, ІМФ). Декілька додаткових реакцій приводять від ІМФ до АМФ або до ГМФ, і нарешті утворюються АТФ та ГТФ.

Основними попередниками біосинтезу ліпідів є:

3-фосфогліцерин, який утворюється з діоксиацетонфосфату – проміжного продукту гліколізу;

жирні кислоти, які утворюються з ацетил-КоА.

У грамнегативних бактерій муреїнова сітка є одношаровою і становить менше 10 % сухої маси клітинної стінки. У всіх грамнегативних бактерій зверху одношарового чи найбільше двошарового муреїнового мішка розміщується зовнішній шар клітинної стінки. Це так звана зовнішня мембрана, що складається з білків, фосфоліпідів і ліпополісахаридів (ЛПС).

Схему зображено в додатку 1.

Ферменти: 1–манітол-фосфаттрансферазна система; 2–манітол-1-фосфат 5–дегідрогеназа; 3–глюкозофосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 4–фосфофруктокіназа (КФ. 2.7.1.11); 5–фруктозобіфосфатальдолаза (КФ4.1.2.13); 6–гліцеральдегідтрифосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12); 7–фосфогліцераткіназа (КФ. 2.7.2.3); 8–гліцератфосфомутаза та фосфогліцератфосфомутаза (КФ. 5.4.2.11); 9–енолаза (КФ.4.2.1.11); 10–піруваткіназа (КФ.2.7.1.40), 11 – піруватдегідрогеназа (КФ 1.2.4.1), 12–цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 13 – аконітатгідратаза (КФ4.2.1.3); 14 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 15 – сукциніл-КоАгідролаза (КФ 2.8.3.18); 16 – фумаратгідратаза, клас II (КФ 4.2.1.2); 17 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.5.4); 18–гістединдегідрогеназа; 19–ароматично-амінокислотна трансаміназа (КФ 2.6.1.57); 20–префенатдегідрогеназа (КФ 1.3.1.12); 21–триптофан-синтаза (КФ 4.2.1.20); 22–аланін-синтезуюча трансаміназа (КФ 2.6.1.66 2.6.1.2); 23–фосфосеринфосфатаза (КФ 3.1.3.3); 24–5-метилтетрагідроптероїлтриглутамат - гомоцистеїн метилтрансфераза (КФ 2.1.1.14); 25–гліцин гідроксиметилтрансфераза (КФ 2.1.2.1); 26–аланін-синтезуюча трансаміназа (КФ 2.6.1.66 2.6.1.2); 27–валінамінотрансфераза(КФ 2.6.1.42); 28–лейцинамінотрансфераза з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42); 29–ізолейцин - ізолейцинамінотрансфераза з розгалуженим ланцюгом (КФ 2.6.1.42); 30–лізін - діамінопімелат-декарбоксилаза (КФ 4.1.1.20); 31– діамінопімелат-декарбоксилаза (КФ 4.1.1.20); 32– глутамат-синтезуюча трансаміназа (КФ 2.6.1.66 2.6.1.2); 33–пролін-5-карбоксилатредуктаза (КФ 1.5.1.2); 34–

аргініносукцинальний ліаза (КФ 4.3.2.1); 35– глутамін синтетаза (КФ 6.3.1.2); 36– пролін-5-карбоксилатредуктаза (КФ 1.5.1.2); 37– транкетолаза (КФ 2.2.1.1); 38– рибоза-фосфатна пірофосфокіназа (КФ 2.7.6.1); 39– амідифосфорібосілтрансфераза (КФ 2.4.2.14); 40– аспартат карбамоїлтрансфераза (КФ 2.1.3.2); 41– дигідроортаза (КФ 3.5.2.3); 42– дигідрооратдегідрогеназа (КФ 1.3.5.2); 43– оротат фосфорібосілтрансфераза (КФ 2.4.2.10); 44– оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.23); 45– уридилат-кіназа (КФ 2.7.4.22); 46– нуклеозид-дифосфаткіназа (КФ 2.7.4.6); 47– цтф синтаза; 48– УДФ-3-О- [3-гідроксимірістоіл] N-ацетилглюкозаміндеацетилаза (КФ 3.5.1.108); 49– УДФ-3-О- [3-гідроксимірістоіл] глюкозамін N-ацилтрансфераза (КФ 2.3.1.191); 50– УДФ-2,3-діацилглюкозамін гідролаза (КФ 3.6.1.54);

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

5.1. Обґрунтування до ферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Культивування можна проводити поверхневим або глибинним, періодичним та безперервним методами, в аеробних або анаеробних умовах.

Спосіб культивування залежить від кінцевої мети культивування: накопичування біомаси або отримання окремого продукту життєдіяльності мікроорганізму (метаболіту).

Поверхневий метод. Поверхнєве культивування заключається у вирощуванні аеробних мікроорганізмів на поверхні рідких і твердих поживних середовищ. При цьому мікроорганізми отримують кисень безпосередньо із повітря.

Даний спосіб культивування не може бути використаний, оскільки не забезпечить достатнього рівня стерильності в зв'язку з високим ризиком контамінації культури сторонньою мікрофлорою, що є недопустимим при виробництві вакцини

Глибинний метод . Цей метод культивування дозволяє використання рідких поживних середовищ, в яких мікроорганізми розвиваються по всій товщі. Так як мікроорганізми можуть засвоїти тільки розчинний в воді кисень, розчинить кисню у воді невелика, то для забезпечення росту аеробних мікроорганізмів необхідно постійна аерація.

Глибинне культивування мікроорганізмів може бути періодичним або безперервним і напівбезперервне.

					НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>	<i>Нагорна</i>						39	122
<i>Консульт.</i>								
<i>Керівник</i>	<i>Стабніков</i>							
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Пирог</i>							

Для культивування *Neisseria gonorrhoeae* використовують глибинний спосіб культивування. Глибинне культивування має ряд переваг перед поверхневим, оскільки дозволяє значно зменшити виробничі площі, виключає ручну працю (високий рівень автоматизації), покращити гігієну праці, спрощує механізацію та автоматизацію виробництва, використання глибинного способу культивування дозволяє досягти високого ступеня стерильності та мінімізує ризик контамінації сторонньою мікрофлорою, що особливо важливо при виробництві фармацевтичної продукції.[22]

З вище сказаного можна зробити висновок, що найбільш доцільним та зручним способом культивування продуцента *Neisseria gonorrhoeae* у даній технології є періодичне, глибинне культивування

Оптимальна температура культивування *Neisseria gonorrhoeae* з метою отримання біомаси становить 37 °С, при значнішій зміні температури культивування пригнічується ріст культури. Культура потребує аерацію. Оптимальне значення рН 6.8 –7.3, рН є важливим фактором, що впливає на фізіологію мікроорганізму, впливаючи на розчинність поживних речовин і їх поглинання, ферментативну активність, утворення продукту і нормальне функціонування окисно-відновних реакцій.

Обґрунтування типу ферментера

Тип ферментерів (біореакторів) для кожного біотехнологічного процесу вибирають з урахуванням специфіки продуцента, властивостей середовища та економічних міркувань.

Біореактори поділяють на три основні групи:

- 1) реактори з механічним перемішуванням;
- 2) барботажні колони, через які для перемішування середовища пропускають повітря;
- 3) ерліфтні реактори з внутрішньою або зовнішньою циркуляцією. Перемішування і циркуляція культуральної рідини в них забезпечується

потоким повітря, за рахунок якого між верхнім і нижнім шарами культуральної рідини виникає градієнт щільності.

Оскільки, найбільш доцільним та зручним способом культивування продуцента *Neisseria gonorrhoeae* у даній технології є періодичне глибинне культивування, то найкращим варіантом є використання ферментера з одновальною турбінною мішалкою і барботажною аерацією.

Ферментери з комбінованим введенням енергії місткістю від 10 л мають ряд загальних конструктивних ознак:

Визначившись зі способом культивування та фізіолого-біохімічними особливостями продуцента, обираємо необхідне оснащення для ферментера, яке б забезпечило створення даних умов.

1. У процесі культивування штаму *N. gonorrhoeae* CDC-F62 особливою умовою є подача аераційного повітря.

2. Для інтенсифікації масообмінних процесів та кращої гомогенізації культуральної рідини використовується перемішувач з можливістю регулювання частоти обертів. Оскільки продуцент *N. gonorrhoeae* не утворює міцелій, надлишкові зрізові зусилля не будуть негативно впливати на культуру мікроорганізма, тому для ефективного перемішування культуральної рідини обираємо турбінну мішалку.

3. Для забезпечення сталої температури культивування ферментер оснащується сорочкою і датчиком температури.

4. Для запобігання можливого утворення піни будемо використовувати хімічний спосіб піногасіння.

5. Для контролю рівня рН культуральної рідини ферментер оснащується датчиком рН та датчиком рівня кисню.

З замовленням щодо виробництва ферментера з заданими параметрами можна звернутися до фірми «АЛСИ» [23] що, реалізує лабораторні ферментери об'ємом від 3 до 10л.

Лабораторний ферментер від виробника «BioFlo 320» встановлюється на платформі. Легкість в обслуговуванні і експлуатації забезпечується відкритою конструкцією. Центральне розташування входів і виходів для пара, води, повітря і відпрацьованої води зводить до мінімуму час і зусилля, необхідні для підготовки до роботи.

Мішалки обертаються за допомогою прямого магнітного приводу, що дозволяє забезпечити герметичність та дозволяє регулювати оберти мішалки в широкому діапазоні [23].

Стандартні роз'єми гарантують легкість в установці і заміні датчиків і додаткового устаткування для, аерації, відбору проб, зливу, піногасіння, при складанні та експлуатації.



Рис.3.1 Лабораторний ферментер фірми «BioFlo»,оснащені багаторазовими ємностями BioBLU 320, об'ємом 10л

Устаткування повністю відповідає як національним, так і cGMP / FDA стандартам.

Отже, з усього вищесказаного можна зробити висновок, що для проведення виробничого біосинтезу доцільним є використання ферментера фірми «BioFlo», об'ємом 10 л.

5.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного, вентиляційного та стисненого повітря

Для культивування продуцента гонококової вакцини необхідний високий рівень аерації, тому підготовка стерильного аераційного повітря при культивуванні штаму *Neisseria gonorrhoeae* CDC-F62 є однією з найважливіших задач на виробництві.

Повітря на аерацію в виробничий ферментер подається за допомогою компресора вбудованого в блок управлінням ферментера.

Аераційне повітря для виробничого культивування забирається компресором безпосередньо з приміщення, оскільки повітря в приміщенні вже очищене до класу чистоти В та стерилізується за допомогою індивідуального фільтра (фільтр високої ефективності).[22]

Індивідуальні фільтри встановлюються безпосередньо перед ферментером. Використання ж індивідуальних фільтрів, які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, дає змогу отримати повітря зі ступенем очистки 99,9999%.

У сучасних мікробіологічних виробництвах ставлять високі вимоги до очищення технологічного повітря, що подається для аерації при культивуванні мікроорганізмів продуцентів біологічно активних речовин. Навіть незначна кількість сторонньої мікрофлори в повітрі може призвести до інфікування поживного середовища та різкого збільшення втрат продукту.

Обґрунтування стадії підготовки вентиляційного повітря

Виробництво стерильних лікарських засобів повинно виконуватися в чистих виробничих зонах, у які доступ персоналу, обладнання і матеріалів повинен відбуватися через повітряні шлюзи. У них повинен підтримуватися належний ступінь чистоти, що регламентується правилами GMP, а вентиляційне повітря, що надходить, повинне проходити очищення з використанням фільтрів відповідної ефективності.

Оскільки, препарат являє собою фармацевтичний продукт, а саме вакцину, що одержується з використанням патогенного мікроорганізма, для забезпечення належних умов стерильності та захисту від можливої контамінації, його виробництво має проводитись в чистих приміщеннях з класом чистоти не нижче В. [24]

У приміщеннях не нижче В класу чистоти використовуємо ламінарний потік повітря[25].

5.1.3. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікувальних засобів

Санітарна обробка (миття та дезінфекція) приміщень, технологічного обладнання, комунікацій, внутрішньоцехової тари, інвентарю, санітарно-технічного обладнання та інших об'єктів підприємств з виробництва лікарських засобів є невід'ємною стадією технологічного процесу, спрямованої на забезпечення регламентованої мікробіологічної чистоти продукції і епідемічної безпеки технологічного процесу [26].

Препарати, які використовуються для миття та дезінфекції повинні відповідати ряду вимог, серед яких: широкий спектр антимікробної активності, безпека для людини та навколишнього середовища, хороша розчинність в воді, ефективність при взаємодії з органічними забрудненнями, нейтральний запах тощо.

Щоб обрати мийний та дезінфікувальний засіб, необхідно враховувати його вартість та витрати на оброблювання потрібної площі виробничого приміщення. Приблизно на 1 м² затрачається 100 мл робочого розчину мийних чи дезінфікувального засобу.

Вибір засобів для миття та дезінфекції

"Септомакс-НП" – дезінфекційний засіб випускається у вигляді порошкоподібної маси від білого до світло-жовтого кольору з помірним запахом хлору.

Препарат призначений для дезінфекції поверхонь приміщень, обладнання, інвентарю, спецодягу при проведенні профілактичної

дезінфекції, знезараження поверхонь приміщень, твердих меблів, зовнішніх поверхонь апаратів і приладів при проведенні профілактичної дезінфекції на підприємствах хіміко-фармацевтичної, мікробіологічної і біотехнологічної промисловості з виробництва нестерильних лікарських засобів у приміщеннях класів чистоти С і D, а також на підприємствах косметичної та хімічної промисловості.

Робочі розчини засобу "Септомакс-НП" готують безпосередньо перед використанням. Допускається зберігати невикористаний робочий розчин протягом 7 діб після приготування за умови його зберігання у затемненому місці у посуді зі щільно закритою кришкою [27].

"САНІМАКС" – рідкий висококонцентрований нейтральний дезінфекційний засіб з помірним піноутворенням для дезінфекції, передстерилізаційного очищення, поточних і генеральних прибирань та мийки.

Засіб призначений для миття та дезінфекції технологічного обладнання, зовнішніх і внутрішніх поверхонь ємностей і резервуарів, танків, трубопроводів, продуктопроводів (в т.ч. СІР-мийка), фасувального обладнання, інвентарю, тари, посуду, санітарного та спеціального одягу, поверхонь приміщень, сантехнічного обладнання, створення санітарних бар'єрів.

Засіб застосовується у вигляді водних робочих розчинів в концентрації від 0,04% до 0,25% по препарату в залежності від сфери застосування, виду забруднення. Норма витрати робочого розчину - 100 мл / м² . Способи обробки: ручний (протирання, зрошення, занурення, замочування, заповнення), механізований (в т.ч. в підлогомиїних машинах, СІР-мийка), аерозольний [28].

"НОВОХЛОР-ЕКСТРА" – рідкий універсальний концентрований лужний дезінфекційний засіб на основі гіпохлориту натрію і комплексу

допоміжних функціональних компонентів з широкою сферою застосування (дезінфекція, передстерилізаційне очищення, стерилізація).

Сфера застосування:

Миття та дезінфекція технологічного обладнання, ємнісного обладнання, виробничого і лабораторного посуду, інвентарю, внутрішньоцехової і оборотної тари; поверхонь приміщень та виробничого обладнання; Дезінфекція та відбілювання спец. одягу;

Засіб застосовується у вигляді водних робочих розчинів в концентрації по активному хлору від 0,01% до 0,5% в залежності від сфери застосування, цілі обробки, виду забруднення, збудника і об'єктів обробки. Норма витрати робочого розчину - 75-100 мл / м² [19].

Отже, проаналізувавши вище наведені дані, можна зробити висновок, що для дезінфекції технологічного обладнання доцільним буде використання засобу «САНИМАКС». Для дезінфекції стін, підлоги, вікон, дверей а також зовнішніх поверхонь обладнання доцільно використовувати засоби «Септомакс-НП», оскільки вони є мийно-дезінфікувальними засобами, що дають змогу заощадити кошти, також почергове застосування двох різних дезінфікуючих засобів дозволить уникнути утворення резистентних штамів мікроорганізмів.

Таблиця 1.1.

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікувальних засобів для виробництва вакцини гонококової

№	Найменування підрозділів	Кількість підрозділів	Площа що підлягає дезінфекції		Дезінфікуючий засіб			Кратність обробки		
			При поточному прибиранні, м ² (л)	При генеральному прибиранні, м ² (л)	Назва	Концентрація робочого розчину	Норми витрати робочого розчину на 1 кв.м	На добу	На місяць	На рік
1	Обладнання, інвентар, комунікації	3	30	30	'САНИМАКС'	0,25%	100 мл/м ²	—	1	52

2	Підлога	3	20	20	"Септо макс-НП"	1%	100 мл/м ²	1	0	60
3	Стіна, двері, вікна	3	–	45	"Септо макс-НП"	1 %	100 мл/м ²		4	8

5.1.4. Обґрунтування особливостей приготування і стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту та виробничого біосинтезу

Для культивування штаму *Neisseria gonorrhoeae* CDC-F62 для отримання гонококової вакцини використовують середовище даного складу (г/л):

Манітол	20 г/л
Триптон	10 г/л
М'ясний екстракт	10 г/л
Дріжджовий автолізат	5.0 г/л
Хлорид літію	5.0 г/л
Хлорид натрію	5.0 г/л
Гліцин	1.3 г/л
Піруват натрію	3 г/л

Проаналізувавши склад поживного середовища для *Neisseria gonorrhoeae* CDC-F62 можна поділити його на такі композиції(залежно від хімічних властивостей та режиму стерилізації окремих компонентів):

Композиція А: Манітол, дріжджовий автолізат, триптон, м'ясний екстракт, гліцин, (112°C,30хв.)

Композиція Б: Хлорид літію, хлорид натрію піруват натрію (131°C, 40хв)

Згідно розрахунків, наведених у розділі 1, виробниче культивування здійснюється у ферментері об'ємом 10 л, що містить 6,7 л середовища. Підготовка посівного матеріалу відбувається в одну стадію (в колбах на качалці).

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.

Перший етап вирощування посівного матеріалу передбачає культивування в колбах на качалці. Для цього необхідно 0,67 л поживного середовища (див. розділ 1). Для стерилізації компонентів обираємо автоклав з вертикальним завантаженням 5075 ELV-WR, [15].

Композиція А (манітол, дріжджовий автолізат, триптон, м'ясний екстракт, гліцин, піруват натрію в об'ємі 400 мл стерилізуємо в колбі при $t = 112^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хв.

Композицію Б (хлорид літію, хлорид натрію) в об'ємі 230 мл стерилізуємо в колбі при $t = 131^{\circ}\text{C}$ протягом 40 хв.

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, оскільки об'єми поживного середовища невеликі.

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу.

Для виробничого ферментера об'єм середовища становить 6,7 л. Для стерилізації такої кількості поживного середовища також доцільно застосовувати стерелізацію в автоклаві.

Композиція А (манітол, дріжджовий автолізат, триптон, м'ясний екстракт, гліцин,) в об'ємі 5400 мл стерилізуємо в колбах при $t = 112^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хв.

Композицію Б (хлорид літію, хлорид натрію, піруват натрію) в об'ємі 975 мл стерилізуємо в колбі при $t = 131^{\circ}\text{C}$ протягом 40 хв.

5.1.5 Обґрунтування вибору піногасника.

Для боротьби з піною у ферментерах використовують поверхнево активні речовини: рослинні олії (соєву, соняшникову), тваринний жир (лярд,

китовий жир), а іноді мінеральні олії (вазелінову, парафінову), спирти й вищі жирні кислоти. Нерідко в якості піногасників використовують спеціальні синтезовані речовини.

Одним з ефективних типів піногасників є силіконові піногасники. Силіконові піногасники перевершують органічні аналоги по піногасній здатності, працюють швидше, діють довше. Відрізняються економічністю (витрата від 0,00001 до 1%) - їх поверхневий натяг дуже малий і вони швидко розтікаються по піноутворюючому середовищі. Хімічно інертні до більшості речовин - діють незалежно від компонентів, що викликають утворення піни. Застосовуються в широкому діапазоні температур - від -40°C до $+250^{\circ}\text{C}$. Відрізняються малою токсичністю, не леткий, здатний працювати в різних середовищах, пожежо-вибухобезпечний.[29]

Проаналізувавши асортимент піногасників представлений на ринку обираємо піногасник XIAMETER® AFE-1510 Antifoam Emulsion. Даний піногасник може використовуватися для піногасіння у водних середовищах в чистому або розбавленому вигляді. Розведений матеріал повинен бути використаний як можна швидше. Матеріал, будучи розведений у співвідношенні 1:50 зберігає стабільність протягом тижня.

Переваги:

- Ефективний в гарячих і холодних системах.
- Простий у використанні.
- Ефективний у низьких концентраціях.

Склад: 10% силіконова емульсія. Назва INCI: симетикон.

Відповідає нормам МОЗ України, має харчовий статус FDA, USDA, EPA, BGVV, KOSHER, EUROPEAN UNION REGULATIONS [30].

Рекомендована початкова концентрація 100 частин (в перерахунок на активну речовину) на мільйон частин піноутворюючої системи. В перерахунку на об'єм поживного середовища, що буде використовуватись для виробничого культивування (6700 мл), необхідна кількість піногасника

становитиме 0,5 мл. Такий невеликий об'єм піногасника доцільно буде стерилізувати додавши його до композиції А та стерилізувати разом з нею в автоклаві при 112 °С протягом 30 хв.

5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення цільового продукту

Культуральна рідина гонококової вакцини містить мікробну масу живих клітин *Neisseria gonorrhoeae* залишки поживного середовища, продукти метаболізму.

Одержання інактивованих клітин *Neisseria gonorrhoeae* включає такі етапи:

•Перший етап – відділення біомаси продуцента *Neisseria gonorrhoeae* від культуральної рідини

Для концентрування біомаси на сьогоднішній день застосовуються такі методи: *фільтрація, флотація, центрифугування, сепарація* [31].

Розглянемо всі ці методи і оберемо, який найбільше підходить для виділення біомаси *Neisseria gonorrhoeae* від культуральної рідини.

Фільтрування – відділення твердої фази від рідкої шляхом проходження через фільтруючий матеріал або через полімерну мембрану з відповідним діаметром отворів.

Даний метод не є актуальним для відділення біомаси *Neisseria gonorrhoeae* оскільки це призведе до великих втрат біомаси за рахунок проходження частини клітин через пори фільтруючого матеріалу, через що пори фільтруючої мембрани забиваються та потребують заміни чи регенерації.

Флотація – виділення з рідких твердих часток або часток іншої рідини за допомогою продування крізь неї газу. Флотація заснована на прилипанні часток, які треба виділити до пухирців газу.

Застосування методу флотації для відділення клітин *Neisseria gonorrhoeae* від культуральної рідини є недоцільним, оскільки він

призначений для згущення більших і важчих клітин таких як дріжджі та мікроміцети. Крім того, ступінь очищення культуральної рідини від клітин за допомогою даного способу невисокий.

Сепарація – процес оснований на відділенні часточок з різними характеристиками. Рушійною силою процесу являється відцентрова сила.

Ефективність сепарування пропорційна частоті обертів барабану, діаметру с барабану, розміру часток, різниці густин твердої та рідкої фаз. Недоліками є підвищена енергоємність процесу.

Центрифугування – процес зневоднення і розділення суспензій на рідку і тверду фази під дією відцентрових сил. Машини для здійснення таких операцій називаються центрифугами, які підрозділяються на фільтруючі, осаджувальні і комбіновані (осаджувально-фільтруючі).

Переваги

- менші втрати біомаси порівняно з фільтруванням та флотацією;
- можливість автоматизувати процес;
- високий фактор розділення;
- розвинена поверхнею осадження;
- високий ступінь розділення високодисперсних систем.

Для відділення біомаси *Neisseria gonorrhoeae* найдоцільнішим буде використання методу центрифугування, оскільки виробництво культуральної рідини за цикл є не великим.

Даний етап передбачає відділення клітин від культуральної рідини методом центрифугування. Центрифугування проводять при 0,1 - 4 л/хв, протягом 15 хв при 4 °С.

● **Другий етап – інактивація бактеріальних клітин з додаванням ін'єкційної води**

Існує два основних методи інактивації біологічних агентів при виробництві вакцин – це **хімічна** та **фізична** інактивація.

Метод хімічної інактивації заснований на дії хімічних сполук на біологічний агент.

Із *хімічних* сполук для інактивації мікроорганізмів найчастіше застосовують формальдегід, бета-пропіолактон, глутаровий альдегід.

Недоліками хімічних методів інактивації є необхідність додаткової очистки від інактивуєчої сполуки, використання формальдегіду як інактивуєчого агента може призводити до порушення структурної цілісності антигенів, що може призвести до неспроможності організму індукувати антитіла [32].

Однією з найбільш розповсюджених методів *фізичної* інактивації мікроорганізмів є термоінактивація.

Термоінактивація має кілька переваг перед хімічною інактивацією, а саме: відсутність токсичних хімічних речовин, таких як формальдегід, висока відтворюваність, висока збереженість антигенного вмісту та короткий час реакції [32].

Отже, найдоцільнішим для інактивації клітин *Neisseria gonorrhoeae*, буде використання методу термоінактивації. Даний етап передбачає інактивацію бактеріальних клітин, проводять шляхом термічної інактивації, при температурі 80 °C протягом 1 год, з ін'єкційною водою.

5.3. Обґрунтування допоміжних робіт для стадії виділення та очищення цільового продукту.

5.3.1. Обґрунтування вибору способу приготування кінцевої форми продукту.

Кінцева форма препарату вакцини гонококової інактивованої (*Gonococcal vaccine inactivated*) – являє собою суспензію інактивованої культури гонококів в 0,9% розчині натрію хлориду для внутрішньо м'язового введення, в ампулах об'ємом 1 мл [33].

Стандартизація інактивованих клітин

Осаджені промиті інактивовані клітини суспендують в 0.9% розчині натрію хлориду та фенолу.

5.3.2 Обґрунтування вибору та підготовки первинної упаковки

Фасування й упакування продукції є заключними операціями при виготовленні готових лікарських форм. Вибір виду і матеріалу первинної упаковки визначається головним чином властивостями лікарських речовин і конструктивними особливостями самої упаковки з урахуванням її економічності. При цьому одним із головних критеріїв оцінки економічності є матеріал упаковки, яка має не тільки витримувати механічні чи інші навантаження при її заповненні, але й не змінювати при цьому своїх властивостей: кольору, форми, індиферентності, стерильності тощо [34].

Готовий препарат вакцини гонококової випускається у вигляді суспензії, в ампулах об'ємом 1 мл.

Наповнення ампул розчинами проводиться в приміщеннях класу чистоти А–С із дотриманням усіх правил асептики трьома способами: вакуумним, пароконденсаційним і шприцевим.

Вакуумний спосіб наповнення ампул полягає в тому, що ампули в касетах вміщують у герметичний апарат, у ємність якого заливають розчин, що підлягає наповненню, і створюють вакуум; при цьому повітря з ампул відсмоктується, і після скидання вакууму розчин заповнює ампули. Недоліком даного методу є низька точність дозування [34].

Шприцевий спосіб наповнення ампул одержав поширення і виконується за допомогою установок із спеціальними дозаторами (поршневыми, мембранними тощо) [34].

Процес підготовки ампул, включає наступні операції: розтарювання, перегляд і відбраковування (при необхідності), набір в касети (у разі ампул), мийка, стерилізація, охолодження.

Розтарювання, перегляд ампул, набір у касети повинні проводитися у виробничих приміщеннях D класу чистоти.

Мийка ампул, і завантаження їх на сушіння і стерилізацію повинні проводитися у виробничих приміщеннях С класу чистоти.

Перегляд та відбракування ампул, флаконів або пляшок (у разі необхідності) повинні проводитися до миття з метою виключення вторинної контамінації їх мікроорганізмами або механічними включеннями після миття.

Ампули шприцевого наповнення за допомогою передавального пристрою надходять в стерилізатор. У ньому ампули проходять стерилізацію (нагрівання, витримка, охолодження). У зоні стерилізації температура стерильного повітря підтримується в межах 280-350°C, залежно від температури тривалість процесу стерилізації складає від 5 до 30 хвилин. Далі тара передається на охолодження, температура повітря в зоні охолодження регулюється відповідно до вимог технологічної документації.

Ампули наповнюються за допомогою шприцевого методу.

Отже, проаналізувавши методи фасування та упаковки готових лікарських засобів, можемо зробити висновок, що найбільш оптимальним видом первинної упаковки для готового препарату гонококової вакцини є упаковка в скляні ампули.

5.3.3 Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень

Виробництво стерильних лікарських засобів повинно виконуватися в чистих виробничих зонах, у які доступ персоналу, обладнання і матеріалів повинен відбуватися через повітряні шлюзи. У них повинен підтримуватися належний ступінь чистоти, що регламентується правилами GMP, а вентиляційне повітря, що надходить, повинне проходити очищення з використанням фільтрів відповідної ефективності. Чисті зони класифікують по максимально допустимому числу часток в повітрі:

Клас А: Локальні зони для технологічних операцій, які потребують самого мінімального ризику контамінації, наприклад, зони приготування лікарських засобів, наповнення, закупорювання, розкриття стерильних ампул

й флаконів, змішування інгредієнтів в асептичних умовах. Умови класу А передбачають робоче місце з ламінарним потоком повітря ($0,45 \pm 20\%$) м/с.

Клас В: Навколишнє середовище для зони А у випадку приготування, наповнення первинної тари та герметизації її в асептичних умовах [35].

Класи С і D: Чисті зони для ведення технологічних операцій, які допускають більш високий ризик контамінації при виробництві стерильної продукції, стерилізація якого допускається в кінцевій упаковці.

Оскільки, препарат являє собою фармацевтичний продукт, а саме вакцину, що одержується з використанням патогенного мікроорганізму, для забезпечення належних умов стерильності та захисту від можливої контамінації, його виробництво має проводитись в чистих приміщеннях з класом чистоти не нижче В [35].

5.3.4 Обґрунтування вибору підготовки води

Невід'ємною частиною виробництва будь-якого підприємства фармацевтичної промисловості є підготовка (очищення) різних типів води. В залежності від характеру конкретного виробництва (форми готової продукції) на фармацевтичному підприємстві можуть використовуватися різні типи води: вода питна, вода знесолена (демінералізована), вода очищена (дистильована), вода для ін'єкцій (апірогенна) [36].

Вода питна застосовується виключно для господарсько-побутових цілей працівників виробництва і використовується в технологічному процесі лише на деяких стадіях. Однак вона є джерелом для отримання води всіх інших типів.

Демінералізована вода (знесолена) використовується для миття ампул, допоміжних матеріалів та для живлення аквадистилляторів при отриманні води очищеної і води для ін'єкцій.

Вода очищена (дистильована) може використовуватися безпосередньо в технологічному процесі отримання лікарських засобів, як на стадіях основного виробництва, так і для проведення ряду допоміжних стадій у

випадках, коли до процесу пред'являються вимоги підвищеної стерильності. Джерелом одержання води очищеної є вода питна. Вода питна очищується з використанням способів, що включають один з способів — деіонізацію, дистиляцію, іонний обмін, зворотний осмос або комбінацію цих способів.

Вода для ін'єкцій використовується в основному на підприємствах по виробництву препаратів для ін'єкцій. Крім вимог, які пред'являються до води очищеної, вона повинна бути апірогенною, нетоксичною та у ній повинні бути відсутні життєздатні форми біологічних агентів.[37]

Під час проектування системи підготовки води важливим є вирішення вибору способу очистки. Для виробництва вакцини використовують воду очищену та воду для ін'єкцій.

5.4. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях

ТП 5.1 Зберігання культуральної рідини

ТП5.2 Відділення біомаси продуцента *Neisseria gonorrhoeae* від культуральної рідини

ТП 5.3 Інактивація бактеріальних клітин

ТП 5.4 Суспендування інактивованих клітин

ТП 6 Виробництво ампул.

ТП 6.1 Мийка ампул.

ТП 6.2 Сушка ампул

ТП 6.3 Стерилізація ампул

ТП 6.4 Наповнення та запайка ампул

ПМВ 7 Маркування ампул

ПМВ 8 Пакування і відвантаження

1. Вихідні дані:

- об'єм вакцини за цикл - $V_{кр} = 5$ л;
- концентрація біомаси у КР С = 8 г/л;

- втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 11% (прийнято для розрахунку ТЕО КП «Основи проектування»):

початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає $5 \text{ л} \times 8 \text{ г/л} = 40 \text{ г}$; кінцева кількість (з урахуванням 11% втрат) має становити 44 г

- фенолу $5 \times 2,5 = 12,5 \text{ г}$;

- натрію хлориду $5 \times 9 = 45 \text{ г}$

- води для ін'єкцій $5 - (40+12,5+45)/1000 = 4,9 \text{ л} = 4900 \text{ мл}$

2. Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у таблиці

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 11 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 5.1 Зберігання культуральної рідини						
2	ТП 5.1 Зберігання культуральної рідини	КР	6,0 л	–	6,0 л	Збірник КР 10 л
ТП 5.2 Відділення біомаси						
3	ТП 5.2 Центрифугування культуральної рідини	КР	6,0 л	–	–	Центрифуга продуктивністю 0,1 - 4 л/хв.
		Біомаса	44 г АСБ з 70% урахуванням вологості 147 г	7,35 г (5%)	140 г	
		Фугат	5853 мл	204 мл	6000 – 140-204 = 5656 мл	На утилізацію
ТП 5.3 Інактивація бактеріальних клітин						
4	ТП 5.3 Термічна інактивація	Біомаса 70% вологості	140 г	4,2 г (3%)	140-4,2 = 136 г (40,8 г АСБ)	Реактор-змішувач 10 л
		Ін'єкційна вода	2000 мл	–	–	
		Готова суспензія	–	–	2136 мл	

1	2	3	4	5	6	7
ТП 5.4 Приготування кінцевої форми препарату						
6	ТП 5.4 Стандартизація	Інактивовані клітини	2136 мл	–	2136 мл	Реактор-змішувач 10 л
		Розчин NaCl	45 г + 2000 (вода для ін'єкцій)	–	2045 мл	
		Розчин фенолу	12,5 г + 856 мл (вода для ін'єкції)	–	869	
		Готова вакцина	–	–	5050 мл	
ПМВ 7. Пакування, маркування, відвантаження						
7	ПМВ 7 Наповнення, запайка, пакування, маркування ампул вакцини гонококової	Наповнення в ампули цільовий продукт, та запайка	5050 мл	50 мл (1%)	5 000 ампул	Продуктивність машини від 500 до 1000 ампул за годину
		Ампули для розливу	5050	50 (1%)	5 000 ампул	
		Фасування ампул в блістерні ячейки.	5000 ампул	–	500 блістрів	Автоматична лінія для упаковки ампул блістерну чарункову упаковку ZHM-250D. Продуктивність 20 – 80 бліст/хв.

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНЯННЯ

Специфікація обладнання зображеного на апаратурній схемі ділянки післяферментаційних процесів та одержання вакцини гонококової, наведена в табл.

2.1

Таблиця 2.1

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу вакцини гонококової

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
P-1	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач з рубашкою. Матеріал: нержавіюча сталь. Частота обертів мішалки— 24-300 об/хв, t =90°C, об'єм 50 л, працює під атмосферним тиском, з нижнім спуском продукту. Виробник: Україна. Габарити ДхШхВ:0,9х0,85х1,75м [38]
P-2	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач з рубашкою. Матеріал: не ржавіюча сталь. Частота обертів мішалки— 24-300 об/хв, t =90°C, об'єм 50 л, працює під атмосферним тиском, з нижнім спуском продукту. Виробник: Україна. Габарити ДхШхВ:0,9х0,85х1,75м [38]
ОД-3, ОД- 3 (а)	Об'ємний дозатор	1	Дозатор рідинний виробництва НВП "Техноваги" призначений для вагового дозування рідин заданими дозами в ємність. Виробник: Китай. Точність дозування – від 0,1% Габаритні розміри (Д х Ш х В), мм 280 х 280 х 710

<i>НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ</i>					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	
Розробив		Нагорна			
Консульт.					
Керівник		Стабніков			
Н. Контр.					
Затв.		Пирог			
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНЯННЯ			Літ.	Арк.	Аркушів
				60	122

УММ-4	Ультразвукова мийна машина	1	Ультразвукова мийна машина AmpouleКСQ120. Матеріал: нержавіюча сталь. Виробник: Китай. Застосовуваний розмір 1 - 2 мл ампула. Потужність 10,45 кВт. Продуктивність: 33000 шт / год. Розмір мм: 2225 × 2165 × 1400.[40]
АТСУ -5	Ампульна тунельна стерилізаційна сушарка	1	Ампульна тунельна стерилізаційна сушарка ASMR600 / 43. Матеріал: нержавіюча сталь. Виробник: Китай. Застосовуваний розмір 1 - 2 мл ампули. Виробнича потужність 33000 шт / год. Потужність установки: 48,57 кВт. Електрична потужність опалення: 43,2 кВт. Температура стерилізації: 320 °С. Час стерилізації: 5 хвилин. Внутрішня температура ампули 320 °С ± 5 °С. Габарити: (Д * Ш * В): 3180 × 1560 × 2350 (мм)[40]
ПЗ-6	Повітро забірник	2	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень встановлюється на висоті 20 м Габарити, ДхВхГ мм: 145x192x62 [41]
ВУ-7	Приточна вентиляційна установка	3	Приточна вентиляційна установка ССК ТМ SAB-400-Е-2,4. Виробник: «ВЕЗА», Україна. До складу агрегату SAB входить високоефективний безкорпусний відцентровий вентилятор 70 Вт, фільтр кишеньковий класу F5, система автоматики з усіма необхідними датчиками, а також виносним пультом управління. Потужність вентилятора 70 Вт, ступінь очистки фільтру G5. Габарити, ДхВхШ, мм : 830 × 380 × 205 [42]
К-8	Кондиціонер каналний	1	Кондиціонер каналного типу Mitsubishi FDUM40ZMXVF. Потужність 4 кВт, продуктивність 33-36 м ³ /хв. Габарити, ДхВхШ, мм : 750 × 280 × 635[43]

Ф-9	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр повітряний АРФ. Розміри: мм 287х287х600, Клас фільтрації -F9, площа фільтрації 1 м2, Виробник Україна. [44]
Ф-10	Фільтр тонкої очистки	1	Повітряний компактний фільтр тонкого очищення F9 (EU5-EU9) , E = 90%. Виробник: Україна.Компактний фільтр використовується для очищення повітря в різних за призначенням приміщеннях. Фільтр монтується всередині кліматичного обладнання. Максимальна пропускна здатність 150 м3/год. Габарити ДхВхШ, мм : 287х592х292 мм[45]
Ф-11	Фільтр HEPA	1	Бактерицидні фільтри HEPA / ULTRA відрізняються повною герметичністю в місцях з'єднання матеріалу фільтра з алюмінієвим корпусом, що забезпечує тривалість і ефективність експлуатації. Дані фільтри створюються відповідно до стандартів EN 779, EN 1822. Це є безсумнівною гарантією високої якості очищення повітря. Виробник: Україна. Максимальна пропускна здатність 150 м3/год. Габарити, ДхВхШ, мм : 305х305х78[18]
Ф-12	Фільтр ULTRA	1	Фільтр ULPA надтонкого очищення повітря типу ФяС-U Марка фільтра ФяС-U - E (*) 0 05.1П Габарити, ДхВхШ, мм : 305х305х78 [47]
ПЗ-13	Повітро забірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень встановлюється на висоті 20 м Габарити, ДхВхГ мм:145х192х62[41]
Ф-14	Фільтр грубої очистки	1	Фільтр повітряний АРФ. Розміри: мм 287х287х600, Клас фільтрації -F9, площа фільтрації 1 м2, Виробник Україна. [44]

K-15	Компресор	1	Компресор серії ESM 2-6 від виробника GardnerDenver (США) для виробництва високоякісного стисненого повітря для широкого діапазону застосувань. Продуктивність- 450 л/хв, макс. тиск – 10 бар, потужність – 5 кВт, Розміри (ДхШхВ) 600 x 650 x 1100 [48]
T-16	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач стисненого повітря RA 10 ОМІ Італія Встановлюється після компресора для охолодження і попереднього видалення вологи з стисненого повітря. Вага 19 кг Максимальний тиск 16 бар Модель RA 10 Пропускна здатність осушувача до 1000 л / хв Габарити, ДхВхГ мм:550x1200x400 [49]
P-17	Ресивер	1	Ресивер повітряний виробництва компанії GardnerDenver (США) Об'єм - 500 л, макс тиск –16 бар, маса- 185 кг [50]
Ф-18	Фільтр стисненого повітря	1	Фільтр стисненого повітря виробництва компанії GardnerDenver (США) Фільтри серії GDF ефективно видаляють воду і аерозолі нафтопродуктів, атмосферний пил і тверді частинки, іржу, накип і мікроорганізми. Модель GDF005 Пропускна здатність – до 500 л/хв, макс. тиск – 17 бар Габаритні розміри, (Д х В)76 x 225 мм [51]
Ф-19	Фільтр тонкої очистки стисненого повітря	1	Магістральні фільтри стисненого повітря серії AF розроблені і вироблені для високоефективного видалення твердих частинок, вологи, масла, вуглеводнів, запахів і пари з систем стисненого повітря. Модель AF 0056 Пропускна здатність – до 60 м3/год, макс. тиск – 16 бар, Діаметр пор- 0,1 мкм. Габаритні розміри, (Д х В хШ) 187 x 88 x 20 мм [52]

Ф-20	Індивідуальний фільтр	1	Капсульні фільтри з гідрофобною ПТФЕ мембраною площею 210 см ² , використовуються для стерелізаційної фільтрації повітря / газів для лабораторних ферментерів і як стерильний вихід повітря для автоклавів та інших ємностей. Витримують до 100 циклів стерилізації в автоклаві, діаметр пор 0,2 μm Фільтруюча здатність 99.9999% Габарити, ВхШ, мм : 25 x50 [53]
Ф-21	Фільтр механічного очищення	1	Фільтр механічного очищення ECOSOFT FP 1354CT Продуктивність робоча, 1,35 м3/год Габаритні розміри фільтра, (В х Д), 159 x 34 см [54].
Ф-22	Фільтр вугільний	1	Фільтр вугільний OrganicBigBlue 10. Макс. продуктивність: 80 л / хв. Робоча температура: 4 - 45 ° С Макс.робочий тиск: 8 бар Типорозмір картриджа: 10 x 4,5 "Розмір Ш х Г х В: 180 x 180 x 310 мм [55].
УПВ-23	Установка пом'якшення води	1	Установка пом'якшення води Nerex DxF1054-CV-Alt. Продуктивність: 1,2 - 2 м ³ / год. розроблена для зниження рівня жорсткості вихідної води при безперервній роботі[56].
УЗ-24	Установка знесолення води «OptionPlus»	1	Установка зворотнього осмосу LPRO640-S. Кількість ємкостей тиску 5 шт., кількість мембран 25 шт. Виробник: «Nerex», США. Продуктивність — 7/15/30/60 л/год, Габарити установки: Д*Ш*В-2000*650*1500[57]
ЗБ-25	Збірник	1	Збірник для води з нержавіючої сталі 316. Об'єм 2000 л. Виробник: Китай Габарити: Д*Ш*В-1340*1500*2750 [58]
ТДУ-26	Трьохкорпусна дистиляційна установка.	1	Трьохкорпусна дистиляційна установка GMPMax WFI Still, матеріал; нержавіюча сталь марки

			AISI 316L. Продуктивність до 200 л/год. з можливістю регулювання продуктивності в діапазоні 60 - 100%, Виробник: Китай, Габарити 3500*2100*1350 [59]
Н-27	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий AI-RED 135 Корпус насоса: високоякісна сталь AISI 304, з різьбовими патрубками ISO 228/1; Продуктивність: 160 л/хв, максинальний тиск: 4 бар. Виробник: Італія Габарити 296*186*206 [60]
ЗБ-28	Збірник горизонтальний	1	Збірник для інєкційної води. Матеріал: нержавіюча сталь. V = 2000 л, працює під атмосферно-вакуумним тиском, з нижнім спуском продукту. Виробник: «Стройторгсервіс», Україна. Габаритні розміри: 212 x 132 мм [61].
АВ-29	Автоклав	1	Лабораторний автоклав з вертикальним завантаженням 5075 ELV-WR Корисний об'єм камери, л: 160 (Ізраїль) Габарити, ДхВхШ, мм : 770 × 1090 × 770 [62].
Н-30	Насос перистальтичний	1	Перистальтичні насоси F / F-T. Матеріал: нержавіюча сталь. Виробник: Китай Швидкість обертання: 108 об/хв. Продуктивність: 0.5÷6 л/год. Тиск: 1 бар. Робота 3,5 сек. Габарити: ДхШхВ: 620x580x1350 [63]
ФЛ-31	Ферментер лабораторний	1	Лабораторний ферментер виробництва компанії Eppendorf Модель BioFlo320, обладнаний змінними автоклавуючими ємностями. Технічні характеристики: Об'єм- 10л, частота обертів мішалки 25-150 об/хв, вага 36 кг Габарити: ДхШхВ: 406x406x600 [64]
Н-32	Насос перистальтичний	1	Перистальтичні насоси F / F-T. Матеріал: нержавіюча сталь.

			<p>Виробник: Китай Швидкість обертання:108 об/хв. Продуктивність: 0.5÷6 л/год. Тиск: 1 бар. Робота 3,5 сек.Габарити: ДхШхВ: 620х580х1350 [63]</p>
ЗБ-33	Збірник	1	<p>Матеріал: нержавіючої сталі, model 90. Технічні характеристики: Об'єм 10 л, Виробник: Росія. Габаритні розміри: 235×220 мм.[65]</p>
Ц-34	Центрифуга	1	<p>Стерилізуюча на місці пілотна проточна центрифуга Centritech VP Pilot. Матеріал: нержавіюча сталь. Швидкість потоку 0,1 - 4 л / хв Виробник:Україна. Габаритні розміри: 840 мм × 1000 мм × 1080 мм.[66]</p>
Р-35	Реактор змішувач	1	<p>Реактор з боросилікатного скла об'ємом 10 л. Модель: GR-10L. Мінімальна робоча температура: -80 ° С. Максимальна робоча температура: 200 ° С. Частота обертання мішалки: 50-500 об / хв. Габаритна висота з піднятою кришкою - 2000 мм [67]</p>
Н-36	Насос перистальтичний	1	<p>Перистальтичні насоси F / F-T. Матеріал: нержавіюча сталь. Виробник: Китай Швидкість обертання:108 об/хв. Продуктивність: 0.5÷6 л/год. Тиск: 1 бар. Робота 3,5 сек.Габарити: ДхШхВ: 620х580х1350 [63]</p>
МЗЗА – 37	Машина для заповнення та запайки ампул	1	<p>Машина призначена для наповнення і запаювання скляних ампул шприцевого наповнення об'ємом 1, 2, 5 і 10 мл.Продуктивність машини від 500 до 1000 ампул за годину. Матеріал: нержавіюча сталь. Виробник: Україна. Розмір мм (Д * Ш * В): 3600 × 2100 × 2450.[68]</p>

МА-38	Маркувальний апарат	1	<p>Машина для маркування призначена для кругового маркування етикеток на скляних ампулах WT-10. Матеріал: нержавіюча сталь. Виробник: Росія. Обсяг ампули: 1-20 мл мм. довжина етикетки: 15-50 мм. Висота етикетки: 15-40 мм</p> <p>Блок живлення: 220 В, 50 Гц, потужність: 0.3 кВт</p> <p>Габаритні розміри: 1600мм x 600мм x 1250мм.[69]</p>
АЛУА-39	Автоматична лінія для упаковки ампул	1	<p>Автоматична лінія для упаковки ампул ZHM-250D. Матеріал: нержавіюча сталь. Виробник: Росія.</p> <p>Продуктивність: 20- 80 блістерів / хв, Розмір упаковки: 8300 × 1400 × 1700 мм.</p> <p>Специфікація коробки (Д × Ш × В): (65 -170)×(45-80)×(15-50)мм.[70]</p>

РОЗДІЛ 7.ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Санітарна підготовка виробництва включає в себе наступні етапи: підготовка персоналу; підготовка виробничих приміщень; підготовка обладнання, комунікацій; приготування дезінфікуючих розчинів.

Всі ці етапи є невід'ємною частиною підготовки до виробничого процесу виділення вакцини гонококової.

Обслуговуючий персонал приступає до роботи, попередньо провівши санітарну підготовку виробництва і пройшовши санітарно-гігієнічну обробку.

Після проведення санітарної підготовки обладнання та приміщення на обладнання і двері приміщення прикріплюють відповідні ідентифікаційні картки, на яких вказано: «Обладнання очищене, назва та вміст дезрозчину, дата і підпис відповідальної особи».

Перед початком роботи проводять огляд та підготовку всього устаткування до проведення технологічного процесу, а також експлуатацію всього обладнання відповідно до вимог регламенту.

В процесі роботи все технологічне обладнання забезпечується відповідними ідентифікаційними картками з вказівкою найменування стадії (операції) процесу або напівпродукту номеру серії (операції) та дати, прізвища оператора, майстра.

ДР 1.1 Приготування миючих та дезінфікуючих засобів.

Для запобігання контамінації та дотримання чистоти на підприємстві використовують миючі засоби. Розчини готують в реакторах. Приготовані миючі та дезінфікуючі засоби використовують з метою для санітарної обробки (миття та дезінфекції) приміщень, технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю, санітарно-технічного обладнання тощо

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 7.ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркуші</i>
<i>Розробив</i>		<i>Нагорна</i>						68
<i>Консульт.</i>							68	122
<i>Керівник</i>		<i>Стабніков</i>						
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Пирог</i>						

ДР 1.1.1 Підготовка дезінфікуючих розчинів для обладнання

Для обробки устаткування та інвентарю та комунікацій готують розчин препарату "Санімакс" (концентрація 0.25 %), Розчин готують у збірниках (Р 1), за допомогою дозатора (ОД 3) завантажують кількість очищеної води й миючого засобу, розчин перемішують, звідки самопливом розчини подають по нержавіючих сталевих трубопроводах до місць використання.

ДР 1.1.2 Приготування розчину для миття та дезінфекції приміщень

Для обробки приміщення (підлога, стіни, вікна, двері) використовують розчини "Септомакс-НП" та "Новохлор - Екстра" (концентрація 1 % та 0,5% відповідно)

Розчин готують у збірнику (Р 2), за допомогою дозатора (ОД 3 а) завантажують кількість очищеної води й миючого засобу, розчин перемішують, звідки самопливом розчини подають по нержавіючих сталевих трубопроводах до місць використання.

ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень.

Підготовка виробничих приміщень до роботи включає в себе вологе прибирання, дезінфекцію, ультрафіолетове опромінювання стін, підлог та інших поверхонь. Підготовка виробничих приміщень поділяється на щоденну та генеральну. Прибирання проводять в спецодязі, спеціально призначеному для цієї мети.

Прибиральні матеріали та інвентар зберігаються окремо і використовуються тільки за призначенням. Обов'язково в гумових рукавичках, в чотиришаровій марлевій пов'язці або респіраторі

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання.

Працюючий персонал видаляє виробничі відходи (у разі необхідності) потім збирає розсіпані порошки і механічні забруднення.

Прибирання виробничих приміщень відбувається в такій послідовності: матеріали для прибирання перед використанням знезаражують у розчині дезінфекційного засобу; проводять вологе прибирання: стіни, двері та інші

поверхні виробничих приміщень миють теплою водою і висушують або витирають досуха; після висушування проводять дезінфекцію поверхонь.

Миття проводять з використанням засобів "Септомакс-НП" та "Новохлор – Екстра"- це засоби які дозволяють поєднати два процеси – миття і дезінфекцію, що дуже зручно для підготовки приміщень.

Після проведення прибирання виробничих приміщень робиться запис в журналі санітарної підготовки виробничих приміщень. Прибирання виробничих приміщень слід проводити щозміни. Відпрацьований розчин направляється на знешкодження відходів.

ДР 1.2.2 Генеральне прибирання.

Генеральне прибирання проводять вологим способом раз на 5-6 днів наприкінці робочого тижня. Стіни, двері, стеля та інші поверхні рясно обприскують з гідропульта або вручну робочим розчином з розрахунку.

Після цього персонал покидає приміщення, і його зачиняють на 30-40 хв. Потім надлишок розчину прибирають за допомогою безворсових серветок. Особливо забруднені місця додатково миють цим же розчином.

На чисте приміщення поміщають етикетку з датою обробки та підписом особи, яка відповідає за обробку.

ДР 1.4. Підготовка обладнання та комунікацій.

Виробниче обладнання не має подавати ніякої небезпеки для продукції. Підготовку технологічного обладнання проводять до та після проведення технологічного процесу.

ДР 1.4.1. Миття обладнання.

Обробку технологічного обладнання та комунікацій проводять з розчином 0.25 % «Санімакс» який пропускають від при температурі 60 °С протягом 40-50 хв.

Збірник та центрифугу обробляють мийно-дезінфікуючим розчином 0,25 % «Санімакс», після кожного центрифугування. Проводять процес при температурі 60 °С, по завантажувальній лінії ферментера. Після дезінфекції проводять

мікробіологічний контроль, кількість життєздатних клітин не повинна перевищувати $3 \cdot 10^2$ КУО/мл.

ДР 1.4.2 Ополіскування обладнання та комунікацій

Ополіскування проводиться очищеною водою, при температурі 36 °С упродовж 30 хв. Відпрацьована вода йде до знешкодження відходів.

ДР.1.4.3. Перевірка на герметичність

Існують сучасні методи для перевірки обладнання на щільність. Один із таких є метод, який оснований на вловленні витоку галогенних газів приладом тече-шукачем, який вловлює мікроконцентрації витоку газу.

Тетрахлорметан закачують в герметично закрите обладнання та комунікації до тиску 0,5 МПа та за допомогою прилада– тече-шукача галогенопохідних, проводять огляд всіх з'єднань обладнання та комунікацій. Особливу увагу приділяють фланцевим з'єднанням та ущільненню кришок місткісного обладнання. У випадку виявлення нещільних з'єднань проводять розбору та профілактичне ущільнення обладнання та комунікації. В якості ущільнюючого матеріалу використовують термостійку гуму, пароніт, фторопласт.

ДР.1.4.4. Стерилізація обладнання

Стерилізація устаткування здійснюється гострою парою при температурі 130 °С і надлишковому тиску 0,3 МПа. Тривалість операції складає приблизно 40 хвилин. Параметри стерилізації забезпечують знищення мікрофлори.

ДР 1.4.4 Миття допоміжного обладнання

Для підготовки допоміжних обладнання у першу чергу готують інвентар, який буде використовуватися у найближчий час у відповідності з графіком роботи, а особливо: силіконові шланги, колби, пінцети, пробки.

Весь інвентар, який використовується у виробництві, оброблюється у ванні з нержавіючої сталі теплою водою (40 °С). У воду додають миючий засіб, і замочують на 20-30 хв, миють інвентар всередині і ззовні, споліскують, водопровідною, а потім очищеною водою та передають його для остаточної обробки.

ДР 2 Підготовка ампул.

ДР 2.1 Мийка ампул.

Перший етап – розпаковка ампул та подача на конвеєрну стрічку, ампули потрапляють в апарат для миття (УММ-4). Процес миття ампул починається з промивки водою за допомогою ультразвуку, наступний етап – перевертання ампул капіляром в низ з наступним миттям зовнішньої поверхні ампули.

Наступна стадія це промивка внутрішньої поверхні ампули відбувається шляхом введенням голки в ампулу з подальшим миттям циркуляційною водою і друга промивка відбувається аналогічним методом, потім відбувається продування ампули очищеним стисненим повітрям шляхом введення голки в ампулу. Далі відбувається промивання ампули ін'єкційною водою.

ДР 2.2 Сушка ампул

Стадія сушки ампул розпочинається з продування з очищеним стисненим повітрям методом введення голки в ампулу. Наступна стадія це зовнішнє продування ампули очищеним стисненим повітрям, потім відбувається механічний поворот ампули капіляром вгору і ампула передається на стерилізацію.

ДР 2.3 Стерилізація ампул

Процедура стерилізації здійснюється в стерилізаційному тунелі (АТСУ 5), де відбувається також подальше охолодження стерильних ампул. При попаданні в тунель стерилізації ампули рухаються по ньому із заданою швидкістю, при цьому ампули продуваються ламінарним потоком повітря, що подається в тунель під тиском. Температура ламінарного потоку становить до +350 °С, що забезпечує максимально якісну стерилізацію. На виході з ламінарного тунелю ампули охолоджуються холодним повітряним потоком.

Етап стерилізації починається з попереднього нагріву ампул, для попередження розтріскування при нагріванні до температури стерилізації, стерилізацію ампул проводять шляхом нагрівання до температури 350 °С, після цього ампули охолоджуються, і вивантажуються для наповнення.

ДР 3 Підготовка вентиляційного повітря приміщень класу чистоти.

ДР 3.1 Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають повітрязабірником (ПЗ-6) через забірний повітропровід) на висоті 12-15 м, де стабільна концентрація мікроорганізмів. На цій стадії контролюється тиск у повітропроводі.

ДР 3.2. Попередня очистка повітря

Використовують фільтр який знаходиться в приточній вентиляційній установці (ВУ-7) для видалення механічних часток. Ефективність очищення по механічним часткам 0,3-10 частинок/м³ Використовуваний в приточній вентиляційній установці кишеньковий фільтр класу G5 характеризується тривалим терміном експлуатації і відмінною здатністю утримувати різного роду забруднення. Фільтри попереднього очищення істотно знижують кількість контамінантів в вентиляційному повітрі.

ДР 3.3. Кондиціонування повітря

Комфортна температура в чистих приміщеннях підтримується за рахунок кондиціонування повітря за допомогою встановленого каналного кондиціонера (К-8) на рівні від 19 до 23°C зимою та від 21 до 25°C літом, відносна вологість повітря – від 30% до 50%.

ДР 3.4. Очищення повітря для класу D

В якості фільтра для очищення повітря до класу чистоти D (Ф-9) використовують вугільні або губчасті фільтри . Такі фільтри здатні вловлювати частинки розміром від 50 мкм. При цьому вони мають клас фільтрації F5-F9. Вони використовуються як друга ступінь очищення повітря в приміщеннях з підвищеними вимогами до чистоти повітря.

ДР 3.5. Очищення повітря для класу C

Для очищення повітря відповідно до вимог класу чистоти C, використовуються фільтри типу HEPA (Ф-10). Фільтруючим матеріалом у них виступає скловолокно, викладене в гофру для збільшення площі фільтрації. Такі

фільтри здатні вловлювати частинки, менші 30 мкм. При цьому вони мають клас фільтрації H10 - H11

ДР 3.6. Очищення повітря для класу В

Для очищення повітря відповідно до вимог класу чистоти В використовуються фільтри зі ступенем очистки H 12 типу HEPA (**Ф-11**). Такі фільтри здатні вловлювати частинки, менші 10 мкм.

ДР 3.7. Очищення повітря для класу А

Для очищення повітря відповідно до вимог класу чистоти А використовуються фільтри зі ступенем очистки H 14 типу ULPA (**Ф-12**). Такі фільтри здатні вловлювати частинки, менші 5 мкм.

ДР 4. Підготовка стисненого та аераційного повітря

У процесі культивування в ферментері зростаюча культура аерується стерильним повітрям під надлишковим тиском 0,01 – 0,03 МПа для задоволення біологічної потреби мікроорганізмів в кисні.

ДР 4.1. Забір атмосферного повітря

При визначенні місця забору атмосферного повітря необхідно враховувати існуючі та можливі джерела газоподібних забруднень (димарі, автотранспорт, газоподібні промислові викиди та інші).

Особливо багато мікроорганізмів над поверхнею землі, з висотою концентрація їх зменшується і стає постійною на рівні близько 30 м над землею, тому забір атмосферного повітря відбувається на висоті близько 15–20 м. Забір повітря здійснюється повітрозбірником (**ПЗ-13**).

ДР 4.2. Грубе очищення повітря

На цій стадії на фільтрі (**Ф-14**) з повітря видаляється основна маса великих фракцій механічних та пилу. Для цього використовують фільтри попереднього очищення.

ДР 4.3. Стиснення повітря

За допомогою компресора (**К-15**) повітря стискають до 0,35 МПа, при температурі 200 °С. Тиск повітря у компресорі забезпечують відповідно із розрахунку тиску на подолання опору в системі підготовки повітря.

ДР 4.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Після компресора (**К-15**) повітря охолоджується в теплообміннику (**Т-16**) до температури 25 °С. Далі у ресивері (**Р-17**) відбувається стабілізація вологості повітря $W = 60 \%$.

ДР 4.5. Очищення повітря в головному фільтрі

Подальше очищення повітря відбувається у фільтрі (**Ф-18**) з діаметром пор 1 мкм, як фільтрувальний матеріал використовують синтетичні волокна. Ступінь очищення такого повітря становить $E = 95 \%$. Заміну фільтрувального матеріалу проводять 2 рази на рік. Але у разі передчасного забруднення, або зволоження чи інфікування фільтруючого матеріалу проводять позачергову заміну.

ДР 4.6. Очищення повітря в фільтрі тонкої очистки

Подальше тонке очищення повітря відбувається у фільтрі (**Ф-19**) з діаметром пор 0,5 мкм, як фільтрувальний матеріал використовують синтетичні волокна. Ступінь очищення такого повітря становить $E = 99,9 \%$.

ДР 4.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Стиснене аераційне повітря подається на касетний індивідуальний фільтр (**Ф-20**), що встановлюється базпосереднь на ферментері, ступінь чистоти 99,995%.

ДР 5. Підготовка води очищеної та ін'єкційної

В технологічному процесі виробництва вакцини гонококової використовується вода очищена та вода для ін'єкцій, що відповідає вимогам фармакопейної якості.

ДР 5.1.Забір води водопровідної

Надходження води відбувається з міського водоканалу в фільтр (**Ф-21**).

ДР 5.2. Очищення води від механічних частинок.

Груба фільтрація дає можливість очищувати воду від частинок розміром більше 80 – 100 мкм. В якості для обладнання грубої фільтрації використовують фільтри (Ф-21).

ДР 5.3. Очищення на вугільних фільтрах.

Вода очищена від механічних частинок поступає на вугільний фільтр, це дозволяє знизити концентрацію органічних речовин і хлору. В установці (Ф-22) використовуються стандартні патронні фільтри з активованим вугіллем. Придатність фільтрів контролюється різницею тисків води до і після фільтра. Матеріал – вугілля активоване підлягає щоквартальному контролю на вміст хлору.

ДР 5.4. Пом'якшення води за допомогою катіоно обмінної смоли

Далі вода поступає в установку для пом'якшення води (УПВ-23), яка призначена для вилучення з води катіонів Ca, Mg, Fe, Mn за допомогою катіоно обмінної смоли. Установка повністю автоматична, не потребує електричного живлення. Вона складається із двох паралельно включених фільтрів. При цьому завжди працює тільки один із них, а другий знаходиться в режимі регенерації або очікування. Коли обмінна здатність смоли виснажується він автоматично переключається в режим регенерації, а замість нього починає працювати другий. Всі переключання режимів роботи фільтрів проходять автоматично з допомогою одного блоку управління.

ДР 5.5 Очищення зворотнім осмосом

Для отримання води фармакопейної якості (очищеної) використовується зворотно осмотична установка «Rochem» (УЗ-24) (вода з електропровідністю до 30 мкСм/см).

ДР 5.6 Зберігання та розподіл води очищеної

Очищена вода подається в збірник (ЗБ-25) для зберігання в якому підтримується стала температура. Очищена вода надходить до технологічних стадій виробництва.

ДР 5.7 Попередній підігрів

Процес підігріву відбувається у збірнику до температури 80°C (ЗБ-25).

ДР 5.8. Дистиляція

Далі вода надходить в багатоколонний дистилятор (ТДУ-26), де вона остаточно очищується у відповідності до вимог для води для ін'єкцій.

ДР 5.9.Зберігання води для ін'єкцій

Отримана таким чином вода для ін'єкцій за допомогою відцентрового насосу (Н-27) перекачується до баку для зберігання (ЗБ-28) при температурі 80 °С та постійній циркуляції.

ДР 6. Приготування та стерилізація поживних середовищ.

ДР 6.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці.

Для вирощування інокуляту в колбах на качалці необхідно приготувати 0.67 л поживного середовища (10 % від об'єму середовища стадії 1). Джерелом вуглецю в середовищі виступає манітол, як джерело нітрогену – м'ясний екстракт та триптон. Вміст компонентів для приготування 0.67 л поживного середовища наведено у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,67 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 0.67 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Манітол	20	14	А	433
Триптон	10	7		
М'ясний екстракт	10	7		
Дріжджовий автолізат	5	4		
Гліцин	1.3	1		
Вода		400		
Піруват натрію	3	2	Б	237
NaCl	5	3		
LiCl	4	2		

Вода		230		
				Разом 670

ДР 6.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 14 г манітолу, 7 г м'ясного екстракту, 7 г триптону, 4 г дріжджового автолізу, 1 г гліцину. Наважки поміщають у колбу об'ємом 500 мл, додають 400 мл дистильованої води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві (АВ-29) при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 6.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 2 г хлориду натрію, 3 г хлориду літію, 2 г пірувату натрію. Наважки поміщають у колбу об'ємом 250 мл розчиняють у 230 мл води, перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві (АВ-29) при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 6.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу.

Для виробничого культивування у ферментері об'ємом 10 л необхідно приготувати 6,7 л поживного середовища. Вміст компонентів для приготування 6,7 л поживного наведено у табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 6,7 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 6,7 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Манітол	20	134	А	5786
Триптон	10	67		
М'ясний екстракт	10	67		
Дріжджовий автолізат	5	34		
Гліцин	1.3	9		
Вода		5400		
Піруват натрію	3	20		

NaCl	5	34	Б	443
LiCl	4	27		
Вода		975		
				Разом 6700 мл

ДР 6.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 134 г манітолу, 67 г м'яного екстракту, 67 г триптону, 34 г дріжового екстракту, 9 г гліцину. Розчиняють у 5400 мл очищеної води, розливають у колби об'ємом 1000 мл. Закривають колбуватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві (АВ-29) при температурі 112 °С упродовж 30 хв.

ДР 6.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 34 г хлориду натрію та 27 г хлориду літію, наважки поміщають у колбу об'ємом 1000 мл та розчиняють у 975 мл очищеної води. Закривають колби ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві (АВ-29) при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 7. Приготування розчинів для стандартизації вакцини

ДР 7.1 Приготування 0.9% розчину натрію хлориду

Для суспендування інактивованої біомаси *Neisseriagonorohoeae* необхідно приготувати 1442 мл 0,9 % розчину натрію хлориду.

На технічних вагах в зважують 42,38 г NaCl, поміщають в колбу з боковим відводом на 1500 мл, потім в колбу доливають 700 мл ін'єкційної води, перемішують до повного розчинення. Потім цю колбу закривають пробкою та стерилізують в автоклаві (АВ-29) при 131 град. протягом 40 хв. Потім після стерилізації, в асептичних умовах за допомогою силіконової трубки, переливають розчин в реактор змішувач (Р-35)

ДР 7.2 Приготування 0.25% розчину фенолу

На технічних вагах в асептичних умовах зважують 11,77 г фенолу в колбу з боковим відводом на 1000 мл, потім в колбу доливають 1000 мл ін'єкційної води перемішують до повного розчинення. Приготований розчин закривають пробкою

асептичних умовах до колби підключаємо силіконову трубку, для переливу розчину в реактор змішувач (P-35)

ТП 8. Підготовка посівного матеріалу

ТП 8.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *N. gonorrhoeae CDC-F62* зберігають у пробірках зі скошеним агаром GCBза температури -80°C.

ТП 8.2. Одержання робочої культури

Музейну культуру, яка зберігається у пробірках на скошеному агарі, суспендують фосфатним буфером та розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі із середовищем GonococcalBase (GCB), культивують при 37 °C протягом 24 год.

ТП 8.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах

Отримані з ізольованих колоній пересівають петлею в пробірки зі скошеним середовищем GonococcalBase (GCB), (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1см. Тривалість вирощування – 24 год.

ТП 8.4. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у колбу об'ємом 750мл вносять компоненти поживного середовища.

У пробірку з робочою культурою *N. gonorrhoeae CDC-F62*, вносять 5 мл стерильного фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають водою), піпеткою відбирають одержану суспензію і вносять у колбу з розлитим поживним середовищем. Вирощують мікроорганізми у колбах на качалці упродовж 24 год.

ТП 9. Біосинтез

ТП 9.1 Виробниче культивування

Виробниче культивування здійснюють у одноразовому ферментері (ФЛ-31) об'ємом 10 л. У ферментер, за допомогою перистальтичного насоса (Н-30) вносять стерильну композицію, та композицію Б.

Посівний матеріал у вигляді культуральної рідини об'ємом 0.67 л в стерильних умовах через вноситься в ферментер Тривалість культивування становить 1 доба (24 годин), рН 6.8 –7.3, температура культивування становить $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Через кожні 3 години проводиться відбір проб для контролю концентрації біомаси, а також мікробіологічного контролю. Процес культивування зупиняють при досягненні культурою концентрації клітин –8 г/л.

ТП 10. Виробництво вакцини

ТП 10.1 Зберігання культуральної рідини

Зберігається культуральна рідина об'ємом 4 л в збірнику (ЗБ - 33) об'ємом 5 літрів при температурі 4 градусів, протягом не довше 24 годин.

ТП 10.2 Відділення біомаси продуцента *Neisseria gonorrhoeae* від культуральної рідини

Культуральна рідина з збірника переходить в центрифугу (Ц-34) де відбувається відділення клітин від культуральної рідини методом центрифугування. Процес центрифугування проходить при швидкості потоку 4 л/хв. Центрифугування відбувається протягом 15 хвилин при температурі 8 °С. Біомасу збирають вручну та переносать до реактора змішувача для інактивування.

ТП 10.3 Інактивація бактеріальних клітин

З центрифуги до реактора змішувача біомасу переносить в ручну персонал в асептичних умовах за допомогою колби . Потім відбувається етап інактивації в реакторі змішувачі (Р-35) об'ємом 5 л.

Даний етап передбачає інактивацію бактеріальних клітин-*/ шляхом термічної інактивації, при температурі 80 °С протягом 1 год.

ТП 11 Стабілізація

Кінцева форма препарату вакцини гонококової інактивованої (*Gonococcalvaccineinactivated*) – являє собою суспензію інактивованої культури гонококів в 0,9% розчині натрію хлориду з додаванням фенолу в якості консерванта [4].

В ректор змішувач (**Р-35**) з суспензією інактивованих клітин та ін'єкційної води, в стерильних умовах з дотриманням вимог асептики за допомогою силіконовою трубки переливають стерильні розчини 0,9 %, натрію хлориду та 0,25% фенолу. Після внесення всіх компонентів вмикають мішалку та перемішують суспензію протягом 15 хв.

Концентрацію клітин контролюють за стандартним зразком мутності бактеріальних суспензій (10 МО).

ТП 12 Наповнення та запайка ампул

Наповнення та запайка ампул проводиться з використанням автоматичної машини для наповнення та запайки ампул (**МЗЗА-37**). Наповнення ампул відбувається в три етапи: спочатку в ампулу подається інертний газ, витісняючи повітря, потім подається вакцина за допомогою поршневого дозатора, і знову - струмінь інертного газу, після чого ампула негайно поступає на позицію запаювання.

Процес запаювання відбувається за допомогою запаювання з відтягуванням капіляра під дією струменя стиснутого повітря.

ПМВ 13 Пакування і маркування ампул

ПМВ 13.1 Маркування ампул

Процес маркування ампул проводиться за допомогою автоматичної машини для маркування (**МА-37**), що наклеює етикетки на скляні ампули.

Автоматичний маркувальний апарат для наклеювання самоклеючих етикеток на поверхню ампул LM-15 – економічний і простий в експлуатації апарат, що використовується у фармацевтичній, косметичній промисловості для маркування фармацевтичних препаратів в ампулах і флаконах. Спосіб маркування включає завантаження ампул у бункер, переміщення їх у комірки циліндричного ротору і передавання в зону маркування, де на них наносять самоклеючу етикетку

Машина для маркування складається із похило розташованих бункера, змонтованого під ним циліндричного ротора з комірками для ампул, приладу для нанесення етикетки, направляючої для транспортування маркованих ампул.

ПМВ 13.2 Пакування ампул в блістерну упаковку.

Технологічний процес пакування ампул виконується за допомогою автоматичної лінії для упаковки ампул ZHM-250D (АЛУА-39). Процес пакування починають з формування чарункового блістера для ампул з полівінілхлориду (ПВХ). Сформований блістер заповнюється ампулами та заклеюється ПВХ-плівкою або фольгою з наступним нанесенням номера партії і дати випуску на блістери.

ПМВ 13.2 Пакування блістерів в картонну упаковку.

Запаяний блістер передається на картонажний автомат, де відбувається формування картонної пачки, складання інструкції з наступною подачею блістера і інструкції в коробку. Завершаючою стадією упаковки є нанесення номера партії і дати випуску на картонну пачку.

ЗВ 14 Знешкодження відходів

ЗВ 14.1 Знешкодження рідких відходів

Відпрацьовані робочі розчини мийно-дезінфікуючих засобів підлягають зливанню до каналізаційної системи після нейтралізації активного хлору тіосульфатом натрію.

Супернатант культуральної рідини, залишки суспензії після інактивації є основними рідкими відходами виробництва гонококової вакцини, та можуть містити у своєму складі живі клітини продуцента *Neisseria gonorrhoeae*, оскільки даний продуцент відноситься до патогенних мікроорганізмів та відноситься до класу небезпеки BSL III відходи даного етапу виробництва відносяться до медичних відходів класу Б та повинні утилізуватись у відповідності з нормативними вимогами поводження з медичними відходами.

Для знезараження рідких відходів виробництва проводять їх обробку під тиском та температурою за допомогою спеціального обладнання – установок для знезараження відходів категорії Б, зокрема автоклавів, які використовуються для дезінфекції відходів при температурі стерилізації не менше 132°C протягом 60

хвилин; Знезаражені рідкі відходи підлягають подальшій утилізації(за необхідності) та зливаються до каналізаційної системи.

ЗВ 14.2 Знешкодження газоподібних відходів

Відпрацьоване повітря утворене на етапі ферментації містить аерозоль в якому можлива наявність патогенного продуцента, для унеможливлення потрапляння патогену до виробничих приміщень відпрацьоване аераційне повітря пропускається через бактеріальний фільтр.

ЗВ 14.3 Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи утворені на етапі санітарної підготовки виробництва та етапі приготування поживного середовища, представлені пакувальною тарою мийно-дезінфікуючих засобів та компонентів поживного середовища в подальшому сортуються та піддаються вторинній переробці.

ЗВ 14.4 Знешкодження залишків готової продукції.

При виробництві, зберіганні та застосуванні вакцин та імунобіологічних препаратів виникає потреба знищення частини препарату, непридатного до застосування.

Вакцини, їх залишки й ампули з-під препаратів класифікуються як медичні відходи класу Г [71]. Процес утилізації проводиться централізовано, то його здійснюють спеціальні організації. Вони повинні мати сертифікат на утилізацію відходів класів Б і Г

Знищення вакцин та їх залишків відбувається згідно з правилами, встановленими для даного виду відходів. Для збору залишків препарату повинні використовуватися одноразові вологостійкі ємності (контейнери).

Для їх утилізації використовується метод - спалювання в високотемпературних печах.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль проводять з використанням методів світлової мікроскопії. У разі відсутності у зразку сторонньої мікробіоти під час мікроскопіювання можна побачити клітини *Neisseria gonorrhoeae*, що відповідають наступним характеристикам:

- Бактерії овальної або кулястої форми (коки) з сусідньою стороною увігнутою, розмір бактерії становить близько 0,6 – 1,0 мкм.

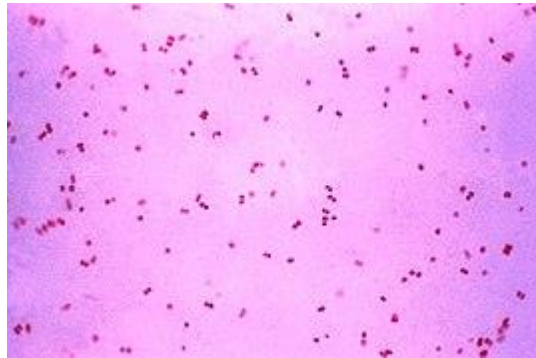


Рис 3. *Neisseria gonorrhoeae* вигляд під мікроскопом

- Розташовані поодинокі або парами (диплококи), з сусідньою стороною увігнутою
- Нерухлива бактерія. Бактерія не має джгутиків, можуть бути присутні фімбрії,

Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини. Краплю, яка містить мікроорганізми, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі (діаметр мазка близько 1 см). Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Потім на абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1–2 краплини імерсійного масла.

					<i>НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ</i>			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Лім.	Арк.	Аркушів
Розробив		Нагорна					85	122
Консульт.								
Керівник		Стабніков						
Н. Контр.								
Затвер.		Пирог						

Після роботи ватною, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки масла з імерсійного об'єктива [72].

Це капсульована бактерія, капсула охоплює кожну пару коків. Капсули можна легко помітити, використовуючи підфарбований препарат, виглядають вони як прозорі включення на темному тлі [73]. Чистоту культури обов'язково контролюють шляхом мікроскопії. Для цього готують препарат фіксованих забарвлених клітин, який проводять мікроскопію з імерсійною системою.

З культури продуцента відбирають проби культуральної рідини: з колб у стерильних умовах пробу відбирають стерильною піпеткою, з інокулятора і ферментера пробу відбирають використовуючи пробовідбірники.

8.1.1 Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища

Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища проводять шляхом розсівання проби простерилізованого поживного середовища на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем: СА – для виявлення грибів і дріжджів і МПА – для виявлення бактерій.

Посів

Стерильною піпеткою відбирають 0,1 мл простерилізованого поживного середовища і наносять її на поверхню відповідного поживного середовища. Внесену пробу рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами поміщають у термостат для інкубації при температурі 37 °С протягом 1-2 діб для МПА та при температурі 24-26 °С протягом 3-5 діб для СА [72].

На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту.

8.1.2 Мікробіологічний контроль чистоти виробничої культури *Neisseria gonorrhoeae* (посівного матеріалу)

Мікробіологічний контроль чистоти виробничої культури здійснюється шляхом висіву на агаризоване поживне середовище GCB методом

виснажувального штриха, інкубують при 37°C протягом 24 год з подальшим мікроскопіювання.

Аналіз посівного матеріалу на забруднення іншими мікроорганізмами здійснюється шляхом прямого висіву посівного матеріалу до ізолюваних колоній на чашки Петрі з м'ясо–пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, та глюкозо–картопляним агаром (ГКА) або сусло–агаром (СА) – грибів та дріжджів.

При візуальному контролі аналізують ріст культури по штриху на поверхні агаризованого середовища GCB; в тому випадку, якщо ріст неоднорідний, вважають, що культура забруднена. Зовнішній вигляд колоній повинен відповідати морфолого-культуральним особливостям продуцента *Neisseria gonorrhoeae*, а саме відповідати таким характеристикам:

- Відношення до фарбування за Грамом – грамнегативна
- Колонії гладкі, прозорі, блискучі, розміром 0.5–1 мм з круглими краями.
- Чітка золотисто-коричнева пігментація [74].

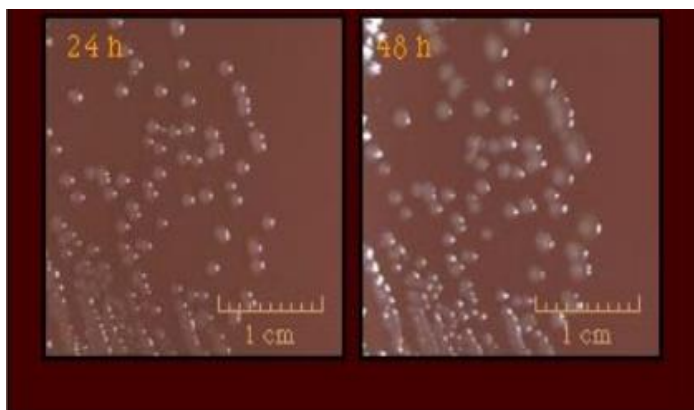


Рис. 1. Зовнішній вигляд колоній *Neisseria gonorrhoeae*



Рис. 2. Пігментація колоній *Neisseria gonorrhoeae*

8.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

8.2.1. Визначення біомаси

Визначення біомаси мікроорганізмів проводять ваговим методом.

Визначення біомаси складається із трьох послідовних операцій:

1. Доведення маси центрифужних пробірок або фільтрів до постійного значення,
2. Відокремлення клітин мікроорганізмів від культуральної рідини,
3. Визначення їх маси.[72]

Довести масу центрифужних пробірок та фільтрів до постійної. З поверхні щільного живильного середовища чашок Петрі провести змив культури мікроорганізмів великою кількістю дистильованої води. Потім провести фільтрування через паперовий фільтр. Потім фільтр розмістити до сушильної шафи та довести його масу до постійної. Маса культури визначити за формулою. Із колби в центрифужну пробірку наливають точно виміряний обсяг ретельно перемішаної рідкої культури в обсязі 5 мл. Проводять центрифугування з 3000 об/хв протягом 25 хв. Потім надосадову рідину зливають. Осад промивають підкисленою водою, а пробірки знову ставлять на центригування. Потім масу пробірки доводять до постійної. Маса культури визначають за формулою.

Сушу біомасу визначають за формулою:

$$M = \frac{(A - B)1000}{V}$$

де М - суха біомаса в г/л; А - маса центрифужної пробірки (фільтра) з осадом у г; В - маса центрифужної пробірки (фільтра) без осаду в г; V - обсяг культуральної рідини, узятий для центрифугування (фільтрування) у мл. Точність методу визначається повнотою відмивання клітин від компонентів середовища й ретельністю зважування.

8.2.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення вмісту амінного азоту методом формольного титруванням

Визначення змісту амінного азоту в поживних середовищах проводять методом формольного титрування. Принцип методу заснований на блокуванні формальдегідом при рН 7,0 вільних аміногруп і титрування лугом еквівалентної кількості карбоксильних груп. Початок і кінець титрування визначають потенціометрично.

Реактиви:

- 1) натрію гідроксид (0,1 моль / л) або розчин соляної кислоти (0,1 моль / л);
- 2) натрію гідроксид 10% -й розчин;
- 3) розчин формаліну (40% -й розчин формальдегіду)

Хід визначення

У склянку місткістю 50 мл наливають 10 мл попередньо отриманого супернатанту з культуральної рідини, і доводять загальний об'єм дистильованою водою до 20 мл. Електроди потенціометра занурюють в досліджуваний розчин, рН якого доводять до значення 7,0 за допомогою розчину натрію гідроксиду (0,1 моль / л) або розчину соляної кислоти (0,1 моль / л) .

До нейтралізованого розчину додають 2 мл нейтрального формаліну, перемішують і, не виймаючи електроди, титрують зміст розчином натрію гідроксиду (0,1 моль / л) до рН 9,1. Проводять два паралельних вимірювання.

Зміст амінного азоту в досліджуваному зразку у відсотках (X) обчислюють за такою формулою.

$$X = \frac{V * K * 1.4 * 100}{A * 1000}, \text{ де}$$

V - об'єм розчину натрію гідроксиду (0,1 моль / л) в мілілітрах, який пішов на титрування досліджуваної проби від рН 7,0 до 9,1;

K - поправка до титру розчину натрію гідроксиду (0,1 моль / л);

1,4 - кількість амінного азоту в міліграмах, еквівалентну;

A - кількість рідкого зразка (мл), взятого на аналіз;

100 - коефіцієнт перерахунку міліграмів в відсотки;

1000 - коефіцієнт перерахунку міліграмів в грами [75].

Визначення концентрації джерела вуглецю

Даний метод призначений для визначення концентрації манітолу, заснований на використанні кількісної реакції манітолу з розчином калію періодату та методу йодометричного титрування.

Суть методу:

Метод заснований на кількісній реакції манітолу, що міститься в культуральній рідині з розчином калію періодату в кислому середовищі.

Відібрану пробу культуральної рідини об'ємом 15 мл центрифугують при 5000 об/хв протягом 15 хв. Відбирають 10 мл одержаного супернатанту для подальшої пробопідготовки. Одержану пробу об'ємом 10 мл, що містить близько 200 мг манітолу розводять в 10 разів дистильованою водою до одержання концентрації манітолу в пробі близько 20 мг/мл.

Процес йодометричного титрування

В 3 колби для титрування (паралельні проби) поміщають по 5 мл розчину досліджуваного зразка, додають 5 мл води, 20 мл розчину періодату калію в сірчаній кислоті, перемішують, закривають пробками та витримують при кімнатній температурі 15 хв. В кожну пробу додають 5 мл 20% розчину калію йодиду, закривають пробками та витримують в темному місці 5 хв. Виділившийся йод титрують 0,02 М розчином тіосульфату натрію до солом'яно-жовтого забарвлення, далі додають 5 крапель 1% розчину крохмалю в 15% розчині хлориду натрію (утворюється синє забарвлення). Продовжують титрування до зникнення синього забарвлення.

Паралельно проводять титрування при таких же умовах контрольних зразків з 5 мл води замість досліджуваного розчину.

Концентрацію манітолу (X мг) в аналізованій пробі розраховують за формулою:

$$X = \frac{\Delta V * 0.3643}{a}, \text{ де}$$

ΔV – різниця об'ємів 0,02 М розчину тіосульфату натрію витраченого на титрування контрольного та досліджуваного зразків

0,3643 – коефіцієнт еквівалентності 1 мг манітолу до 0,02 М розчину тіосульфату натрію.

a – об'єм досліджуваної проби (5 мл в нашому випадку) [76]

8.2.3. Карта постадійного контролю доферментаційних процесів

Таблиця 5.1.

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
К _т 1.1 Очищення повітря від пилу і механічних часток	Повітря, ступінь чистоти	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Пезперервно при подачі повітря	E = 80%
К _т 1.2 Кондиціонування повітря	Повітря, температура, вологість повітря	Термометр технічний, психрометричний метод	Пезперервно при подачі повітря	t = 25-40 °С, W=60-70%
К _т 1.3 Очищення повітря у фільтрі тонкої очистки	Повітря, вміст часток, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Пезперервно при подачі повітря після очищення повітря у фільтрі тонкої очистки	E = 99 %
К _т 1.3 Очищення повітря у фільтрі надтонкої очистки	Повітря, вміст часток, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Пезперервно при подачі повітря після очищення повітря у фільтрі надтонкої очистки	E = 99.99 %
К _т , К _м 2.1.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці. Приготування і стерилізація композиції А	Композиція А Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	P = 0,05МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти
К _т , К _м 2.1.2 Приготування та стерилізація	Композиція Б Тиск, температура, час, стерильність	Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний	Температура визначається безперервно під час стерилізації,	P = 0,15МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність

<p>поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці.</p> <p>Приготування і стерилізація композиції Б</p>		й контроль	мікробіологічний контроль після стерилізації	мікробіоти
<p>Кт, Км 2.2.1</p> <p>Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу.</p> <p>Приготування і стерилізація композиції А</p>	<p>Композиція А</p> <p>Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,05МПа, t = 112 °С, τ = 30 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 2.2.2</p> <p>Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу.</p> <p>Приготування і стерилізація композиції Б</p>	<p>Композиція Б</p> <p>Тиск, температура, час, стерильність</p>	<p>Манометр, термометр, годинник, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p>P = 0,15МПа, t = 131 °С, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт 3.1.</p> <p>Підтримання колекційної культури</p>	Температура	Термометр технічний	Безпосередньо в процесі зберігання	t = - 80 °С
<p>Кт, Км 3.2.</p> <p>Одержання робочої культури</p>	Температура, час культивування, відсутність сторонньої мікробіоти	термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування, мікроскопіювання	t = 37 °С, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти

			кожні 6 год	
Кт, Км 3.3. Вирощування культури на агаризованих середовищах	Температура, час культивування, відсутність сторонньої мікробіоти	термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування.	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 3.4. Вирощування культури в колбах на качалках	Температура, час культивування, рН, відсутність сторонньої мікробіоти	термометр, годинник, рН-метр, мікробіологічний контроль	Температура, рН визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль в процесі культивування, мікроскопіювання кожні 6 год	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $\text{pH} = 6.8-7$ відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 4.1 Виробниче культивування	Температура, час культивування, рН, швидкість обертів мішалки, рівень піни, відсутність сторонньої мікробіоти	термометр, годинник, рН-метр, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура, рН, швидкість обертів мішалки, рівень піни контролюється безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль після культивування, мікроскопіювання кожні 6 год	$t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $\text{pH} = 6.8-7,3$ $\omega = 200$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

8.3. Показники якості готового продукту

Таблиця 3.3

Специфікація методів контролю при виробництві вакцини гонококової

Найменування показників	Встановлені значення
Опис	Суспензія жовтувато-сірого кольору з осадом. Після струшування - рідина жовтувато-сірого кольору з однорідно розподіленими в ній частинками. Визначення проводять візуально.
Автентичність	При мікроскопії мазків, забарвлених за Грамом, повинні бути виявлені тільки грамнегативні коки.
Аномальна токсичність	Не токсичні при введенні мишам 0,25 мг, препарату (5 доз) в 0,5 мл- підшкірно
Прозорість	При додаванні в ампулу з вакциною 2 мл розчинника і 2-3 разового струшування препарат повинен мати вигляд

	каламутної суспензії.
<u>Прохідність через голку.</u>	Суспензія, диспергована шляхом струшування, повинна вільно проходити в шприц через голку 0,8×40.
<u>Механічні включення</u>	Препарат має відповідати вимогам
<u>Час седиментаційною стійкості.</u>	Після струшування в суспензії не повинно спостерігатися ознак седиментації і освіти агрегатів і конгломерат протягом 5 хв.
<u>Стерильність</u>	Повинна бути стерильною.
<u>Фенол.</u>	Не більше 2,5 мг / мл.
<u>Натрій хлорид.</u>	Від 8,5 до 9,5 мг/мл
<u>Виробничий штамп.</u>	Оцінка якості виробничих штамів повинна бути вказана в нормативної документації. Виробничі штами повинні володіти морфологічними, культуральними та біологічними властивостями типовими для гонокока. Виробничий штамп повинен оновлюватися через кожні три роки.
<u>Пакування та маркування.</u>	Відповідно до ДФУ «Імунобіологічні лікарські препарати» і ДФУ «Упаковка, маркування та транспортування лікарських засобів».
<u>Транспортування і зберігання.</u>	При температурі від 2 до 8 ° С відповідно до ДФУ «Імунобіологічні лікарські препарати» і ДФУ «Упаковка, маркування та транспортування лікарських засобів». Допускається короткочасне (не більше 24 ч) транспортування при температурі при від 9 до 20 ° С. Заморожування не допускається.

Методи контролю

Справжність: Справжність визначають методами мікроскопіювання та фарбування за Грамом.

Грам-негативна (Грам (-)) *Neisseria gonorrhoeae* утворює з основним барвником і йодом з'єднання, що легко руйнується під дією спирту. В результаті чого клітини *N. Gonorrhoeae* обезбарвлюють і потім забарвлюються фуксином, набуваючи червоного кольору.[77]

Процес фарбування:

1. На фіксований мазок наливають один з основних барвників на 2—3 хвилини. Щоб уникнути осаду фарбують через фільтрувальний папір.
2. Зливають фарбу, акуратно видаляють фільтрувальний папір. Мазок заливають на 1—2 хв розчином Люголя або йодистим розчином, за Грамом (водний розчин йодиду калію і кристалічного йоду в співвідношенні 2:1) до почорніння препарату.
3. Розчин зливають, мазок прополіскують 96° етиловим спиртом або ацетоном, наливаючи і зливаючи його, поки мазок не знебарвиться і рідина, що стікає, не стане чистою (приблизно 20-40-60 секунд).
4. Ретельно промивають скельця в проточній або дистильованій воді 1—2 хв.
5. Для виявлення грам-негативних бактерій препарати додатково фарбують фуксином або сафраніном (2—5 хв).
6. Промивають в проточній воді і висушують фільтрувальним папером.

У мазках, пофарбованих за Грамом, виявлені тільки грамнегативні коки.

Визначення проводять під світловим мікроскопом (збільшення: об'єктив 10 х - окуляр 90 х або об'єктив 10 х - окуляр 100 х).

Час седиментаційною стійкості: Для контролю використовують не менше 4 ампул препарату. Кожну ампулу ретельно струшують, переносять в скляну колбу місткістю 10 мл і проводять ресуспендування протягом 1 хв. Визначення проводять відповідно до ДФУ 2.0 «Лікарські засоби для парентерального застосування».

Стерильність: Визначення проводять методом прямого посіву відповідно до ДФУ «Стерильність».

Випробування на стерильність проводяться для контролю субстанцій, готових ЛЗ або виробів, які відповідно до вимог Фармакопеї мають бути стерильними. Однак задовільний результат аналізу означає лише те, що в умовах випробування у зразку не були виявлені життєздатні мікроорганізми.

Випробування на стерильність проводять за асептичних умов. Зазвичай для випробування використовують стерильні середовища, приготовані як наведено у відповідному розділі ДФУ 2.0, а саме рідке тіогліколеве середовище для

вирощування анаеробних бактерій та соєво-казеїнове живильне середовище для вирощування грибів та аеробних бактерій.[78]

Метод прямого посіву передбачає посів у стерильні пробірки 20 мл води наступним чином: по 10мл в 2 пробірки (об'ємом не менше 30 мл), або по 5 мл в 4 пробірки (об'ємом не менше 15 мл).

Зверху посіви води заливають гарячим (75-80 ° C) железосульфїтним агаром в кількості, що перевищує обсяг води в 2 рази. Середовище заливають по стінці пробірки, намагаючись не допустити утворення бульбашок повітря.

Пробірки з посівами швидко охолоджують в склянці з холодною водою, інкубують при 44 ° C протягом 24 ч.

За методом прямого висівання лікарський засіб витримує випробування на стерильність, при візуальному обліку не виявляється зростання других мікроорганізмів.[78]

Вміст фенолу. Визначення проводять спектрофотометричним методом відповідно до ДФУ Кількісне визначення фенолу в біологічних лікарських препаратах.

Принцип методу. Метод заснований на реакції формальдегіду з хромотроповою кислотою в середовищі сульфатної кислоти з утворенням сполуки червоно-фіолетового кольору, інтенсивність забарвлення якого пропорційна вмісту формальдегіду. Без зміни об'єму проби можна визначати від 0,05 мг/л до 1,50 мг/л формальдегіду. Межа виявлення 0,05 мг/л.

Пробу, яка містить формальдегід, у мірній колбі на 50 мл доводять до мітки дистильованою водою, ретельно перемішують. З отриманого розчину відбирають 1 мл у мірний циліндр місткістю 10 мл, додають 0,5 мл 2% хромотропової кислоти та 5 мл сірчаної кислоти, перемішують. Циліндр поміщають у водяну баню, витримують на ній 15 хв., потім охолоджують до кімнатної температури та переносять у мірні колби об'ємом 50 мл, доводять до мітки, ретельно перемішують. Фотометрують одержаний розчин з зеленим світлофільтром ($\lambda = 570$

нм) відносно до розчину порівняння у кюветах з товщиною оптичного шару 0,5 см. Концентрацію формальдегіду (мг/мл) знаходять за градуювальним графіком.[79]

У ряд мірних колб місткістю 50 мл вносять 0 – 2,5 – 5,0 – 12,5 – 25,0 – 50,0 мл робочого розчину II формальдегіду, доводять об'єм до мітки дистильованою водою, перемішують. Далі проводять аналіз, як зазначено вище. Розчини фотометрують і будують градуювальний графік в координатах оптична густина – концентрація формальдегіду (мг/мл)[79].

Вмісту натрію хлориду. Визначення проводять Метод Фаянса.

Метод Фаянса базується на прямому титруванні галогенідів стандартним розчином AgNO_3 в присутності адсорбційних індикаторів. Наважку зразку кількісно переносять в мірну колбу, розчиняють в невеликому об'ємі води, доводять об'єм розчину водою до мітки і старанно перемішують [80].

Для визначення вмісту хлориду відбирають аліквотну частину досліджуемого розчину (10-25 мл), переносять в конічну колбу, добавляють 5 крапель розчину флуоресцеїну і титрують стандартним розчином AgNO_3 при неперервному енергійному перемішуванні. Титрування закінчують, коли білий осад забарвиться в червоний колір.

Масову частку NaCl або Cl в пробі вираховують за формулою:

$$\text{Cl} = \frac{C \times V \times f \times M}{10g} \times \frac{V_k}{V_{\text{п}}}$$

де: C і V - відповідно концентрація й об'єм робочого розчину AgNO_3 , витраченого на титрування;

M - молекулярна маса хлору;

q - наважка проби, г; V_k - загальний об'єм досліджуваного розчину, мл;

$V_{\text{п}}$ - об'єм аналізуючого розчину, взятого для титрування, мл.[80]

При зберіганні контролюється дотримання у стерильних повітронепроникних контейнерах з контролем першого розкриття.[78]

При маркуванні повинно контролюватися

- назва і концентрація кожного антимікробного консерванту;

- де застосовано, розчин, має бути використаний спільно з фільтром;
- де застосовано, вільний від бактеріальних ендотоксинів або апірогенний. Ін'єкційні ЛЗ: «для приготування ін'єкцій або інфузій»
[78]

РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

9.1 Опис апаратурно-технологічної схеми автоматизації

Виробниче культивування здійснюють у ферментері з робочим об'ємом 10 л. У попередньо простерилізований ферментер, в асептичних умовах вносять композицію А та композицію Б і посівний матеріал у вигляді культуральної рідини об'ємом 0,4 л

Тривалість культивування становить 1 добу (24 годин), при постійному перемішуванні (200об/хв), рН підтримується на рівні 6.8 –7.3, температура культивування становить $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Через електромагнітний клапан у ферментер подається стерильне аераційне повітря, та виводиться відпрацьоване повітря.

У кожух ферментера подається підігріта вода для підтримання температури культивування, а також виводиться оборотна вода.

Після завершення процесу культивування, культуральна рідина за допомогою перистальтичного насоса передається до збірника культуральної рідини.

Завдання на розробку схеми автоматизації

Таблиця 2.1

№ п/п	Машина, апарат	Параметр, місце відбору сигналу	Допустиме значення параметру	Вид автоматизації	Характер контролю управління	Засоби управління та контролю, реалізація управляючої дії
1		Температура	$37 \pm 1^{\circ}\text{C}$	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату гарячої води
		Рівень рН	6 од.рН $\pm 0,5$ од.рН	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
		Інтенсивність	100-250 об/хв	Регулювання	Стабілізація	АРМ оператора

НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Нагорна			Літ.	Арк.	Аркуші
Консульт.						99	122
Керівник		Стабніков					
Н. Контр.							
Затвер.		Пирог					

РОЗДІЛ 9. АВТОМАТИЗАЦІЯ
ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА

	Ферментер	перемішувач (кількість обертів мішалки за хвилину)		Управління	Частота обертів мішалки	Вплив на зміну частоти обертів мішалки
2	Насос	Стан насоса подачі культуральної рідини до збірника КР	Ввімкнення/вимкнення	Управління	Ручне, дистанційне	Пуск, зупинка з АРМа оператора і кнопка «Стоп» по місцю
3	Збірник культуральної рідини	Рівень культуральної рідини в збірнику	Місце встановлення електрода 0.5 м	Контроль	Сигналізація	АРМ оператора
				Управління	Захист від переповнення збірника	Вплив на насос подачі КР
		Температура	+4°C	Контроль	Відображення, реєстрація	АРМ оператора
				Регулювання	Стабілізація	Вплив на витрату холодної води

9.2. Опис функціональної схеми автоматизації

Контур 1. Показник рН необхідно фіксувати як під час процесу біосинтезу так і при здійсненні допоміжних робіт (стерилізації поживного середовища). Значення рН вимірюється первинним перетворювачем (потенціометричним датчиком рН-метра) (поз. 1а). Аналоговий сигнал від датчика подається на ПЛК перетворюючись у цифровий. При відхиленнях значення рН подача луку автоматично дозується регулюючим органом – аналоговою заслінкою. (поз. 1д), що приводиться в дію за допомогою мембранного виконавчого механізму (поз. 1г). Уніфікований пневматичний сигнал до ВМ надходить з електропневмоперетворювача (поз. 1в). Паралельно дані фіксуються на ПК і при значних відхиленнях сигналізують оператора (технолога) для подальших технологічних дій.

Контур 2. Показник вмісту розчиненого кисню у культуральній рідині вимірюється рідинним газоаналізатором (поз. 2а). Аналоговий сигнал від датчика подається на МПК перетворюючись у цифровий, і в залежності від інтенсивності

споживання кисню мікроорганізмами, автоматично дозується подача аераційного повітря пари в інокулятор регулюючим органом – аналоговою заслінкою (поз. 2д), що приводиться в дію за допомогою мембранного виконавчого механізму (поз. 2г). Уніфікований пневматичний сигнал до ВМ надходить з електропневмоперетворювача (поз. 2в).

Контур 3. Температура культуральної рідини вимірюється постійно за допомогою термоелектричного перетворювача (термопари) (поз. 3а). Сигнал від термодатчика у вигляді величини термоелектрорушійної сили (ТЕРС) надходить до нормуючого перетворювача (поз. 3б) і перетворюється в уніфікований електричний сигнал. Останній йде до ПЛК, конвертується у цифровий. При відхиленнях температури (екзотермічний процес) подача води технічної холодної в сорочку інокулятора автоматично дозується виконавчим механізмом – насосом М (поз. 3д). Уніфікований пневматичний сигнал до ВМ надходить з електропневмоперетворювача (поз. 3в).

Контур 4. Регулювання перемішуючого пристрою. При натисканні кнопки «Пуск» на моторі М (поз. 4а) відбувається перемішування культуральної рідини в апараті із заданою частотою обертів. Керування можна здійснювати як по місцю за допомогою ключа керування так і на щиті (панель дистанційного ручного керування).

Контур 5. Для передачі культуральної рідини до збірника необхідно керувати роботою двигуна насоса подачі культуральної рідини з ферментера у збірник культуральної рідини.

У контурі передбачається: управління з АРМа оператора включенням/відключенням насосу; аварійне відключення насосу кнопкою, розташованою «по місцю» (поз.5а) біля насоса.

Подача напруги на двигун насоса здійснюється за допомогою магнітного пускача КМ1.Є аварійна кнопка «Стоп» по місцю (SB4).

Контур 6. Рівень культуральної рідини в збірнику вимірюється ємнісним датчиком з електропередачою сигналу (поз. 6а). Уніфікований сигнал до ВМ надходить з панелі керування (поз. 6б).

Контур 7. Температура культуральної рідини в збірнику вимірюється постійно за допомогою термоелектричного перетворювача (термопари) (поз. 7а). Сигнал від термодатчика у вигляді величини термоелектрорушійної сили (ТЕРС) надходить до нормуючого перетворювача (поз. 7б) і перетворюється в уніфікований електричний сигнал. Останній йде до ПЛК, конвертується у цифровий. Для охолодження культуральної рідини відбувається подача води технічної холодної в сорочку збірника і автоматично дозується виконавчим механізмом – насосом М (поз. 7д). Уніфікований пневматичний сигнал до ВМ надходить з електро-пнеумоперетворювача (поз. 7в).

9.3. Специфікація засобів автоматизації

Таблиця 2.2

Позиція	Параметр	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Завод виготовлювач
1	2	3	4	5	6
1а	рН	В агрегаті	рН електроди, матеріал – скло, пластик, діапазон вимірювань рН 1...12, максимальна температура – до 80 градусів С, максимально допустимий тиск – 6 бар	APS	Kobold
1б	рН	По місцю	Перетворювач вимірювання рН і окисно-відновного потенціалу, аналоговий вихід	APM-Z	Kobold
1в	рН	На щиті	Електропневматичний перетворювач, вихідний сигнал – 4...20 мА, вихідний сигнал 20...100 кПа	2713-WP	Dwyer
2а	Розчинений кисень	В агрегаті	Промисловий екстрактивний газоаналізатор 3-х	ULTRA-MAT 23	SIEMENS

			компонентний, CO – 0...250 мг/м ³ , CO ₂ – 0...400 мг/м ³ , SO ₂ – 0...400 мг/м ³		
2б	Розчинений кисень	По місцю	Перетворювач вимірювання O ₂ , аналоговий вихід	ULTRA-MAT 23	SIEMENS
2в	Розчинений кисень	На щиті	Електропневматичний перетворювач, вихідний сигнал – 4...20 мА, вихідний сигнал 20...100 кПа	2713-WP	Dwyer
2г	Розчинений кисень	По місцю	Мембранний виконавчий механізм прямої дії для управління кранами та заслінками, управляючий сигнал – 20...100 кПа, крутячий момент – 5...30 нм/бар, кут повороту – 90°	KUP	Kobold
3а	Температура КР	В агрегаті	Термоелектричні перетворювачі (термопари), матеріал виготовлення – латунь, градувальна характеристика хромель-копель (К), діапазон вимірювань: –50...+1100 градусів С, клас точності – 1,0.	1-3, ТХА (К)	ПАО «Тера» Україна
3б	Температура КР	На щиті	Універсальний нормуючий перетворювач для встановлення в шкаф управління, вихідний сигнал термометра опору/термопари, вихідний сигнал – 4...20 мА, напруга живлення --= 24 В	НПТ1	Овен
3в	Температура КР	На щиті	Електропневматичний перетворювач, вихідний сигнал – 4...20 мА, вихідний сигнал 20...100 кПа	2713-WP	Dwyer

3г	Температура КР	На щиті	Панель управління пневматична, для дистанційного ручного управління виконавчими механізмами, $P_{жив.} = 140$ кПа, управляючий сигнал у ручному режимі – 20...100 кПа	ПП12.2	Таурус, Росія
3д	Температура КР	По місцю	Магнітний пускач, робочий струм – 3 А, потужність двигуна – 0,75 кВт, управляючий сигнал – 220 В	3RT2015-1AP01	SIEMENS
4а	Кількість обертів мішалки	На щиті	Частотний перетворювач	ПЧВ 1, 2	«ОВЕН», м. Харків
5а	Насос КР	По місцю	Магнітний пускач, робочий струм – 3 А, потужність двигуна – 0,3 кВт, управляючий сигнал – 220 В	3RT2015-1AP01	SIEMENS
6а	Рівень	В агрегаті	Ємнісний датчик для безконтактного контролю положення предметів, виготовлених з електропровідних і не електропровідних матеріалів, відстань спрацьовування до – 4...25 мм, максимальна частота 50 Гц, вихід - дискретний	EC3025 PPAPL	Carlo Gavazzi
6б	Рівень	По місцю	Блок ручного управління імпульсними виконавчими механізмами, вхід – імпульсний, вихід – імпульсний, перехід ручний/автоматичний режим	БРУ5	ТОВ «Мікрол» Україна

7а	Температура КР	В агрегаті	Термоелектричні перетворювачі (термопари), матеріал виготовлення – латунь, градувальна характеристика хромель-копель (К), діапазон вимірювань: –50...+1100 градусів С, клас точності – 1,0.	1-3, ТХА (К)	ПАО «Тера» Україна
7б	Температура КР в збірнику	На щиті	Універсальний нормуючий перетворювач для встановлення в шкаф управління, вихідний сигнал термометра опору/термопари, вихідний сигнал – 4...20 мА, напруга живлення --= 24 В	НПТ1	Овен
7в	Температура КР в збірнику	На щиті	Електропневматичний перетворювач, вихідний сигнал – 4...20 мА, вихідний сигнал 20...100 кПа	2713-WP	Dwyer
7г	Температура КР в збірнику	На щиті	Панель управління пневматична, для дистанційного ручного управління виконавчими механізмами, Р _{жив.} = 140 кПа, управляючий сигнал у ручному режимі – 20...100 кПа	ПП12.2	Таурус, Росія
7д	Температура КР в збірнику	По місцю	Магнітний пускач, робочий струм – 3 А, потужність двигуна – 0,3 кВт, управляючий сигнал – 220 В	3RT2015-1AP01	SIEMENS

РОЗДІЛ 10 ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

10.1 Аналіз технологічної схеми виробництва цільового продукту на місця емісії твердих, рідких та газоподібних відходів

Технологія одержання вакцини гонококової включає доферментаційні допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка піногасника, приготування і стерилізація поживного середовища для одержання посівного матеріалу, приготування і стерилізація поживного середовища для біосинтезу вакцини гонококової) та ферментаційні технологічні процеси (одержання посівного матеріалу, біосинтез вакцини) та після ферментаційні технологічні процеси (інактивація клітин, центрифугування, промивання клітин буферним розчином, центрифугування, суспендування інактивованих клітин).

Санітарна підготовка виробництва.

Етап санітарної підготовки включає щоденне миття та генеральне прибирання. Для миття та дезінфекції тари, стін, підлоги, вікон, дверей а також зовнішніх поверхонь обладнання використовується два мийних засоби "Септомакс-НП" та "НОВОХЛОП-ЕКСТРА", оскільки вони є мийно-дезінфікувальними засобами. Для миття обладнання, інвентарю, комунікацій зсередини використовуємо засіб "САНИМАКС". Після миття та обробки поверхонь відпрацьовані розчини засобів Септомакс-НП" та "НОВОХЛОП-ЕКСТРА" піддаються переробці та надходять до каналізації.

Приготування і стерилізація поживного середовища для отримання посівного матеріалу і виробничого біосинтезу.

В процесі приготування поживного середовища існує імовірність не відповідності сировини нормативним вимогам, в такому випадку сировина підлягає утилізації.

					НУХТ БТЕК 04.02.26 КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Нагорна				РОЗДІЛ 10 ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ	Літ.	Арк.	Аркуші
Консульт.							106	122
Керівник	Стабніков							106
Н. Контр.								
Затвер.	Пирог							

Також є імовірність порушення режимів стерилізації, в результаті чого поживне середовище міститиме сторонню мікрофлору, в такому разі поживне середовище відбраковується та утилізується.

Тверді відходи, на даному етапі представлено пакувальними матеріалами з компонентів поживного середовища, рідкі відходи являють собою поживне середовище що відбраковується в результаті порушення норм приготування або стерилізації. *Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії твердих та невеликої кількості рідких відходів.*

Підготовка посівного матеріалу.

На даному етапі відбувається отримання посівного матеріалу штаму продуцента з його подальшим масштабуванням шляхом вирощування в колбах на качалці. *Оскільки отриманий посівний матеріал буде використано для засіву виробничого ферментера, відходи посівного матеріалу не будуть враховуватись.*

Виробничий біосинтез.

На даному етапі відбувається отримання культуральної рідини, в якій накопичується цільовий продукт – біомаса клітин штаму продуцента *Neisseria gonorrhoeae* CDC-F62. Оскільки культуральна рідина отримана на даному етапі, надходить на подальшу стадію інактивації бактеріальних клітин, рідкі відходи з даної стадії не враховуємо.

Продуцент гонококової вакцини *Neisseria gonorrhoeae* відноситься до аеробів відповідно в процесі культивування потребує аерації, а отже в процесі культивування буде утворюватися відпрацьоване повітря. Продуцент *Neisseria gonorrhoeae* відноситься до патогенних мікроорганізмів, оскільки відпрацьоване повітря міститиме аерозоль бактеріальних клітин, тому на виході відпрацьованого повітря з ферментера буде встановлено стерилізуючий фільтр. Це унеможливить потрапляння патогенного мікроорганізму до приміщення лабораторії.

Центрифугування

Даний етап передбачає відділення інактивованих клітин від культуральної рідини методом центрифугування. Центрифугування проводять при 5000 об/хв

протягом 15 хв при 4 °С. Осаджені інактивовані клітини передаються на наступну стадію. Відходом даного етапу є супернатанткультуральної рідини. *Передбачаємо, що даний етап є місцем емісії рідких відходів, що відносяться до класу небезпеки BLS III та потребують утилізації.*

Інактивація клітин

Даний етап передбачає інактивацію бактеріальних клітин з ін'єкційною водою, проводять шляхом термічної інактивації, при температурі 80 °С протягом 1 год, з ін'єкційною водою. *Відходи даного етапу виробництва відносяться до класу небезпеки BLS III та потребують утилізації.*

Стандартизація інактивованих клітин

Одержана суспензія інактивованих клітин змішується з розчинами 0,9% натрію хлориду та 0,25% розчином фенолу. *Залишки вакцини утворені на данному етапі виробництва відносяться до медичних відходів класу Г та потребують утилізації.*

Розлив в ампули

Готова вакцина розливається в ампули об'ємом 1 мл.

Залишки вакцини утворені на данному етапі виробництва відносяться до медичних відходів класу Г та потребують утилізації.

10.2 Перспективи впровадження системи екологізації виробництва

10.2.1. Система знешкодження та утилізації рідких відходів

Зважаючи на невеликі об'єми рідких відходів на даному виробництві, необхідності зменшення їх об'ємів немає.

Відпрацьовані робочі розчини мийно-дезінфікуючих засобів підлягають зливанню до каналізаційної системи після нейтралізації активного хлору тіосульфатом натрію.

Партії засобу з вичерпаним терміном придатності або не кондиційні, внаслідок порушення умов зберігання, підлягають поверненню на підприємство-виробник для переробки.

Супернатант культуральної рідини, залишки суспензії після інактивації є основними рідкими відходами виробництва гонококової вакцини, та можуть містити у своєму складі живі клітини продуцента *Neisseria gonorrhoeae*, оскільки даний продуцент відноситься до патогенних мікроорганізмів та відноситься до класу небезпеки BSL III [81], відходи даного етапу виробництва відносяться до медичних відходів класу Б та повинні утилізуватись у відповідності з нормативними вимогами поводження з медичними відходами.

Згідно нормативних вимог для збору рідких відходів класу Б повинні використовуватись одноразові вологостійкі ємності (контейнери). Ємність повинна мати щільно прилягає кришку, що забезпечує її герметизацію і виключає можливість самовільного розливу. Після заповнення ємності співробітник, відповідальний за збір відходів в даному медичному підрозділі закриває її кришкою. Переміщення відходів класу Б за межами підрозділу в відкритих ємностях не допускається.

Відходи класу Б підлягають обов'язковому знезараженню (дезінфекції). Вибір методу знезараження визначається можливостями організації, що здійснює медичну або фармацевтичну діяльність, і виконується при розробці схеми поводження з медичними відходами.

У разі відсутності в організації, що здійснює медичну або фармацевтичну діяльність, ділянки по знезараженню відходів класу Б або централізованої системи знешкодження медичних відходів прийнятої на адміністративній території, відходи класу Б знезаражуються персоналом даної організації в місцях їх утворення хімічними / фізичними методами [82].

Для знезараження рідких відходів виробництва їх обробка під тиском та температурою за допомогою спеціального обладнання – установок для знезараження відходів категорії Б, зокрема автоклавів, які використовуються для дезінфекції відходів при температурі стерилізації не менше 132°C

протягом 60 хвилин; Знезаражені рідкі відходи підлягають подальшій утилізації(за необхідності) та зливаються до каналізаційної системи.

10.2.2. Система знешкодження та утилізації твердих відходів

Тверді відходи утворені на етапі санітарної підготовки виробництва та етапі приготування поживного середовища, представлені пакувальною тарою мийно-дезінфікуючих засобів та компонентів поживного середовища в подальшому сортуються та піддаються вторинній переробці.

10.2.3. Система знешкодження та утилізації готової продукції

При виробництві, зберіганні та застосуванні вакцин та імунобіологічних препаратів виникає потреба знищення частини препарату, непридатного до застосування:

- закінчення терміну придатності;
- порушення режиму «холодовий ланцюг»;
- порушення цілісності ампул (флаконів);
- наявність ампул (флаконів) з неясним або стертим маркуванням;
- зміна зовнішніх властивостей, не позначених в інструкції (наявність пластивців, сторонніх предметів, зміна кольору, прозорості);
- забраковані серії; [83]

Вакцини, їх залишки й ампули з-під препаратів класифікуються як медичні відходи класу Г [84]. Для збору залишків препарату повинні використовуватися одноразові вологостійкі ємності (контейнери). Для їх утилізації використовується метод - спалювання в високотемпературних печах. Займатися цим повинні спеціалізовані компанії . При цьому перед вивезенням вакцин необхідно оформити наряд-допуск, в якому повинні бути вказані:

- Найменування вакцини.
- Причина, по якій вона підлягає утилізації.
- Кількість доз препарату, номер серії, контрольний номер, термін придатності.
- Особи, які відповідають за здійснення і безпеку заходів по знищенню вакцин.

- Порядок, метод, місце і час проведення робіт з утилізації.

Транспортування препаратів до місця знищення повинна відбуватися в твердій тарі і на спеціально обладнаних автомобілях .

Утилізація відходів проводиться організована централізовано.

Якщо процес проводиться централізовано, то його здійснюють спеціальні організації. Вони повинні мати сертифікат на утилізацію відходів класів Б і Г

Знищення вакцин-анатоксинів відбувається згідно з правилами, встановленими для даного виду відходів.

Основним методом усунення небезпечних препаратів є спалювання в високотемпературних печах .

Для утилізації вакцин, їх залишків, потрібні спеціальні установки блокового типу з повним циклом утилізації. В установках утилізації повинні бути виключені процеси сортування та подрібнення (гранулювання) для запобігання можливості передачі патогенів із заражених зон в незаражені.

Високотемпературне спалювання є найбільш ефективним способом утилізації медико-біологічних відходів за допомогою попереднього розкладання органічної складової відходів в безкисневій атмосфері (високотемпературний піроліз), після чого утворена паро- газова суміш (синтез-газ) направляється в камеру допалювання, де проходить повне видалення токсичних речовин [85].

Всі етапи утилізації вакцин строго документуються. При передачі препаратів організації, відповідальної за знищення, оформляється наряд-допуск.

У ньому вказується вся інформація, необхідна для точного обліку кількості та характеру відходів. У них визначається метод, порядок утилізації та особи, що несуть відповідальність за процес.

Після доставки на місце знищення і спалювання вакцин становлять акт. У нього вносять дані з наряд-допуску, а також визначають склад відповідальної за утилізацію комісії.

Вказують спосіб знищення і адреса місця, де був проведений процес. Даний документ є важливим для обліку обороту вакцин, він підтверджує, що препарат був утилізований [86].

Дезінфекція ампул

Тара для зберігання вакцин - ампули і флакони – перед відправкою на переробку також вимагають дезінфекції та стерилізації.

Першим етапом утилізації є подрібнення. Потім проводять процедуру знезараження. Ампули з-під вакцин спочатку дезінфікують за допомогою тривідсоткового розчину хлораміну або п'ятивідсоткового перекису водню.

Після чого їх додатково знезаражують гарячим повітрям або парою. Наприклад можна стерилізувати наступними способами :

- за допомогою кип'ятіння - витримують при температурі 99°C протягом 30 хвилин;
- паром при 110°C протягом 20 хвилин;
- гарячим повітрям при температурі 120°C протягом 45 хвилин.

Знезаражена скляна тара відправляється на переробку [86] .

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сучасні технології виготовлення вакцин. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://accemedin.com/material/6/3715>
2. Gonococcal Vaccine Development: LessonsfromGroup B MeningococcalVaccines. (2017). EBioMedicine, 22, 1. doi:10.1016/j.ebiom.2017.07.026
3. MagnusUnemo, William M. Shafer. Antimicrobial Resistancein Neisseria gonorrhoeae inthe 21st Century: Past, Evolution, andFuture. ClinicalMicrobiology Reviews.2014.p. 587– 613. doi: 10.1128/CMR.00010-14
4. Вакцина гонококковая инактивированная (Гоновакцина) Инструкция по медицинскому применению. Електронний ресурс – Режим доступу: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_18381.htm
5. Вакцина гонококковая. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://med.com.ua/articles/36/635.html>
6. Вакцина гонококковая инактивированная (гоновакцина) (Gonococcal vaccine inactivated (gonovaccine)) *инструкция по применению*. Електронний ресурс – Режим доступу: https://www.vidal.ru/drugs/gonococcal_vaccine_inactivated_gonovaccine_42880
7. Вакцина гонококковая инактивированная. Електронний ресурс – Режим доступу <https://www.microgen.ru/products/vaktsiny/vaktsinagonokokkovaya-inaktivirovannaya/>
8. Вакцина гонококковая инактивированная жидкая (Гоновакцина)Електронний ресурс – Режим доступу: <http://www.biomedservice.ru/price/goods/1/8340>
9. Т.П. Пирог, Ю.М. Пенчук. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: метод. рекомендації до викон. курс. роботи для

- студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навч. – К.: НУХТ, 2014. – 60 с.
10. Morphology and culture characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* (gonococcus or gonococci) Електронний ресурс – Режим доступу: <https://paramedicsworld.com/neisseria-gonorrhoeae/morphology-culture-characteristics-of-neisseria-gonorrhoeae/medical-paramedical-studynotes>
 11. Characteristics of *N. gonorrhoeae* and Related Species of Human Origin. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/ngon.htm>
 12. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія : Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 306 с.
 13. Інфекції, що передаються статевим шляхом (ІПСШ) Електронний ресурс – Режим доступу: <https://phc.org.ua/infekcii-scho-peredayutsya-statevim-shlyakhom-ipssh>
 14. Дерматологія, венерологія: Посібник для студентів, магістрів вищих навчальних закладів / За загальною редакцією О. О. Сизон. — Львів: Каменярь, 2017. — 548 с. :іл. — ISBN 978-966-607-433-0
 15. Рост устойчивости гонореи к антибиотикам: необходимы новые лекарственные средства. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://www.who.int/ru/news-room/detail/07-07-2017-antibiotic-resistant-gonorrhoea-on-the-rise-new-drugs-needed>
 16. Вакцина гонококкова інактивована (Гоновакцина) Електронний ресурс – Режим доступу: <http://www.biomedservice.ru/price/goods/1/8340>.
 17. Вакцина гонококкова. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://med.com.ua/articles/36/635.html>
 18. Державний реєстр лікарських засобів України. Інформаційний фонд Електронний ресурс – Режим доступу:

<http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&rs=37/02-3002%2000%20000>

19. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Електронний ресурс – Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?menu_type=pathway_maps&org=ngo
20. Пирог Т.П. Біохімічні основи мікробного синтезу [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна»/ Т.П. Пирог, Л.В.Ключка. – К.: НУХТ, 2019. – 81 с.
21. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Електронний ресурс – Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ngo01230
22. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання. – К: НУХТ, 2013. – 143 с
23. BioFlor320. Електронний ресурс – Режим доступу: http://www.alsi.ua/index.php?page=menu_new_brunswick&id=626
24. Промислова технологія лікарських засобів [Текст] : конспект лекцій для студ. напряму 6.051401 "Біотехнологія" ден. та заоч. форм навч. Ч. 1 / І. В. Лич ; Нац. ун-т харч. технол. — К. : НУХТ, 2011. — 146 с. — каф. біотехнології мікробного синтезу. З 2011 р. каф. біотехнології і мікробіології ; рекомендовано кафедрою.
25. Сидоров Ю.І., Чуєшов В.І., Новіков В.П. Процеси і апарати хімік око-фармацевтичної промисловості. — Вінниця: НОВА КНИГА, 2009. — 816 с.: іл.

26. Вимоги до миючих і дезінфекційних засобів Електронний ресурс – Режим доступу: http://www.provisor.com.ua/archive/2000/N11/dez_req.php
27. Септомакс-НП. Електронний ресурс – Режим доступу: https://www.mpi-dpr.com.ua/ru/blog/38_septomaks-np-metodichni-vkazivki.html#.X62VrEUzbIV
28. Санімакс. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-sanimaks-interdez-kiev>
29. Силіконові піногасники. КурскХімПром. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://kurskhimprom.ru/catalog/prochie/silikonovye-penogasiteli>
30. Піногасник XIAMETER® AFE-1510 Antifoam Emulsion. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://siloxane.ub.ua/ru/goods/view/2569828/all/penogasitel-dlya-pishchevoy-promyshlennosti-xiameter--afe-1510-antifoam-emulsion/>
31. Обґрунтування способу концентрування біомаси. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://studfile.net/preview/5194042/page:8/#12>
32. Методи інактивації для виробництва вакцини. Електронний ресурс – Режим доступу: https://www.researchgate.net/publication/334645900_Inactivation_methods_for_whole_influenza_vaccine_production
33. Обґрунтування способу концентрування біомаси. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://studfile.net/preview/5194042/page:8/#12>
34. Фасовка і упаковка готових лікарських засобів. Електронний ресурс – Режим доступу: <http://medical-enc.com.ua/fasovka-i-upakovka-gotovyyh-lekarstvennyh-sredstv.htm>

35. Промислова технологія лікарських засобів [Текст] : конспект лекцій для студ. напряму 6.051401 "Біотехнологія" ден. та заоч. форм навч. Ч. 1 / І. В. Лич ; Нац. ун-т харч. технол. — К. : НУХТ, 2011. — 146 с. — каф. біотехнології мікробного синтезу. З 2011 р. каф. біотехнології і мікробіології ; рекомендовано кафедрою.
36. Зденек Павелек, Иржи Монинец, Курс GMP и чистые помещения. VS 07-XL-A-SK01, Vilnius, Lithuania, 27-28 октября 2004 г.
37. Пантелеев А.А., Приходько А.Е. Предварительная подготовка и получение воды очищенной. Медиана-фильтр. 2006. — 8с.
38. Реактор-змішувач. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://tehnolog.com.ua/catalog/pharma/mixers-for-liquid-viscous-and-paste-like-products/>
39. Об'ємний дозатор. Електронний ресурс – Режим доступу <https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/a03>
40. Впровадженна виробничої лінії. Електронний ресурс – Режим доступу: <http://www.gmpmax.com/Details.aspx?id=74>.
41. Повітря забірник вентиляційний. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://www.vozduhovod-alnor.ru/assets/files/produkty-pliki-do-pobrania/RU/USLA-RU-Air-Intake-Exhaust.pdf>
42. Приточна вентиляційна установка [Електронний ресурс]– Режим доступу: <https://smartvent.com.ua/p960346308-pritochnaya-ustanovka-sck.html>
43. Кондиціонер каналного типу Mitsubishi FDUM40ZMXVF [Електронний ресурс]– Режим доступу: <http://mitsubishiheavy.com.ua/upload/medialibrary/multi/FDUM/%D0%A2%D0%B5%D1%85%D0%BD%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B5%20%D1%85%D0%B0%D1%80%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B8%20FDUM%20HI.pdf>

44. Фільтр грубої очистки. [Електронний ресурс] – Режим доступу:
https://newfilter.com.ua/ru/ventiljacionnie_filtri/karmannye-filtry-f5-f9-dlya-ventilyatsii-_izgotovlenie-karmannikov.html
45. Повітряний компактний фільтр тонкого очищення F5-F9. [Електронний ресурс] – Режим доступу:
<https://alterair.ua/uk/product/kompaktnyy-filtr-tonkoj-ochistki-f5-f9-eu5-eu9/>
46. Бактерицидні фільтри HEPA / ULTRA. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://alterair.ua/product/hepa-ultra/>
47. Фільтр ULTRA [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://folter.com.ua/catalog/fyasu15u16>
48. Компресор [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://compressors.ua/ru-ru/vintovye-vozdushnye-kompressory/ESM_2_5
49. Теплообмінник-охолоджувач. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://miroil.com.ua/p1353978883-ohladitel-szhatogo-vozduha.html>
50. Ресивер <https://compressors.ua/ru-ru/resivery/resiveru>
51. Фільтр стисненого повітря. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://compressors.ua/ru-ru/filtraciya-szhatogo-vozykha-i-gazov?product_id=169
52. Фільтр тонкої очистки стисненого повітря. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.omega-air.com.ua/filtr-szhatogo-vozduha-af-seriya>
53. Індивідуальний фільтр. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.acftec.de/filters/pdf/airfilter.pdf.pdf>
54. Фільтр механічного очищення. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://ecosoft.ua/ua/ustanovka-mekhanicheskoy-filtratsii-ecosoft-fp-1354/>

55. Фільтр вугільний. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://rolfis.com.ua/shop/filtry-dlya-vody/magistralnye-filtry/filtr-ugolnyy-organic-big-blue-10.html>
56. Установка пом'якшення води. [Електронний ресурс] – Режим доступу. <https://h2o.kharkov.ua/p707093252-ustanovka-nepreryvnogo-dejstviya.html>
57. Установка знесолення води «OptionPlus». [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.aqua-room.com.ua/nerex-lpro640-s>
58. Збірник. [Електронний ресурс] – Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/2000-liter-316-stainless-steel-water_60402063466.html
59. Трехкорпусна випарна установка [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://www.gmpmax.com/Details.aspx?id=17>
60. Насос відцентровий [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://nep.ua/tsentrobezhnij-nasos-al-red-135>
61. Збірник горизонтальний. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://stprom.com.ua/p1015321687-emkost-nerzhaveyuschej-stali.html>
62. Автоклав. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.masterdent.com.ua/catalog/oborudovanie/sterilizatsionnoe-oborudovanie/gospitalnye-i-laboratornye-avtoklavy/laboratornyy-avtoklav-vertikalnyy-tuttnauer-5075-elv-wr-d-line/>
63. Насос. Електронний ресурс – Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/10Liter-Automatic-Lab-Chemical-Jacket-Layer_1600067325713.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_title.639e18d6E3rLPI

64. Ферментер лабораторний. Електронний ресурс – Режим доступу:http://www.alsi.ua/index.php?page=menu_new_brunswick&id=626
- 65.Збірник. Електронний ресурс – Режим доступу:<https://www.apachestainless.com/Portals/0/Documents/About/Brochures/portable-tanks-brochure-standard-line.pdf>
- 66.Центрифуга. Електронний ресурс – Режим доступу:<https://biotechno.ru/catalog/protochnye-tsentrifugi/sterilizuemaya-nameste-pilotnaya-protochnaya-tsentrifuga-centritech-vp-pilot/>
- 67.Реактор змішувач. Електронний ресурс – Режим доступу:<https://vilitek.ru/products/khimicheskie-reaktory-fermentery-i-komplektuyushchie-dlya-nikh/standartnye-borosilikatnye-reaktory-5-100-litrov/>
- 68.Машина для заповнення та запайки ампул Електронний ресурс – Режим доступу:<https://promvit.com.ua/ampulno-zapachnaya-mashina-azm/>
- 69.Маркувальний апарат. Електронний ресурс – Режим доступу:https://www.minipress.ru/pharma/ukrainian/packing_equipment/automatic-labeling-machines/ampoule-labeling-machine-wt-10/.
- 70.Машина упаковки в блістери. Електронний ресурс – Режим доступу:<https://www.minipress.ru/pharma/ukrainian/equipment-with-reviews/blister-packaging-production-lines/packaging-of-bottles-zhm-250d/>
- 71.Как должна проходить утилизация вакцин. Електронний ресурс – Режим доступу:<https://medservise24.ru/blog/medotkhody-i-obrashchenie-s-otkhodami/kak-dolzha-prokhodit-utilizatsiya-vaktsin/>
- 72.Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162

- «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
73. Morphology and culture characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* (gonococcus or gonococci) Електронний ресурс – Режим доступу: <https://paramedicsworld.com/neisseria-gonorrhoeae/morphology-culture-characteristics-of-neisseria-gonorrhoeae/medical-paramedical-studynotes>
74. Characteristics of *N. gonorrhoeae* and Related Species. Gonorrhea Laboratory Information Електронний ресурс – Режим доступу: <https://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/nkoc.htm>
75. Методи контролю бактеріологічних питательних сред. Методи контролю, біологічні і мікробіологічні фактори. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://docplan.ru/Data2/1/4293831/4293831170.htm#i177766>
76. Визначення концентрації манітолу в біологічних лікарських препаратах. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://docs.cntd.ru/document/554199329>
77. Процедура фарбування по граму в мікробіології. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://uk.kyaaml.org/gram-stain-procedure-4147683-1826>.
78. Фармацевтична технологія : навчальний посібник для семінарських занять провізорів передатестаційного циклу підвищення кваліфікації за спеціальністю «Загальна фармація». Ч. 2 / О. О. Малюгіна, Г. П. Смойловська, О. В. Мазулін. – Запоріжжя : ЗДМУ, 2018. – 88 с.
79. Аналітична токсикологія : практикум для студентів ф-ту хімії та фармації / О. М. Чеботарьов, Т. М. Щербакова, О. М. Гузенко, О. М. Рахлицька. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2019. – 110 с.

- 80.Базель Я.Р., Шкумбатюк Р.С., Воронич О.Г., Сухарева О.Ю., Мага І.М.. Навчальний посібник з курсу «Аналітична хімія». Частина 2. Кількісний хімічний аналіз. - Ужгород: в-во ПП «Штеф», 2012. - ч. 2. -87 с.
81. Класифікація мікроорганізмів-збудників інфекційних захворювань людини по груп патогенності Електронний ресурс – Режим доступу:<https://www.diam.ru/upload/iblock/c34/%D0%A0%D0%B0%D0%B7%D0%B4%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B5%20%D0%BC%D0%B8%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%BE%D1%80%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%B7%D0%BC%D0%BE%D0%B2,%20%D0%B2%D0%BE%D0%B7%D0%B1%D1%83%D0%B4%D0%B8%D1%82%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D0%B9%20%D0%B8%D0%BD%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%B9,%20%D0%B3%D0%B5%D0%BB%D1%8C%D0%BC%D0%B8%D0%BD%D1%82%D0%BE%D0%B2%20%D0%B8%20%D1%8F%D0%B4%D0%BE%D0%B2%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%B3%D1%80%D1%83%D0%BF%D0%BF%D0%B0%D0%BC%20%D0%BF%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D0%BE%D1%81%D1%82%D0%B8,%20%D1%80%D1%83%D1%81%D1%81%D0%BA,%2022%20%D1%81%D1%82%D1%80..pdf>
- 82.Санітарно-епідеміологічні вимоги до поводження з медичними відходами. Електронний ресурс – Режим доступу:<http://www.vector.nsc.ru/page/668/>
- 83.Порядок знищення непридатних до використання вакцин і анатоксини. Методичні вказівки. Електронний ресурс – Режим доступу:<http://www.businesspravo.ru/Docum/DocumShow.asp?DocumID=97047&DocumType=0>

84. Як повинна проходити утилізація вакцин. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://medservise24.ru/blog/medotkhody-i-obrashchenie-s-otkhodami/kak-dolzhna-prokhodit-utilizatsiya-vaktsin/>
85. Методи утилізації біологічних відходів. Електронний ресурс – Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/j-pdf/Ponp_2012_34_13.pdf.
86. Електронний ресурс – Режим доступу: <https://rcycle.net/othody/meditsinskie/utilizatsiya-vaktsin-s-istekshim-srokom-godnosti-i-neprihodnyh-k-ispolzovaniyu>].

Cultivation of *Neisseria gonorrhoeae* in Liquid Media and Determination of Its In Vitro Susceptibilities to Quinolones

Masaya Takei,^{1,2*} Yuko Yamaguchi,² Hideyuki Fukuda,² Mitsuru Yasuda,¹
and Takashi Deguchi¹

Department of Urology, Gifu University School of Medicine, Gifu 501-1194, Japan,¹
and Discovery Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.,
Tochigi 329-0114, Japan²

Received 8 March 2005/Returned for modification 13 April 2005/Accepted 13 June 2005

The cultivation of *Neisseria gonorrhoeae* by use of fastidious broth (FB) was evaluated. FB was found to be able to support the growth of all *N. gonorrhoeae* strains tested in this study without a rapid decrease in the viable count after exponential growth. After 24 h of incubation at 35°C with 5% CO₂, viable counts of all strains reached over 10⁸ CFU/ml in FB. Similar growth of the wild-type strain and its target-altered quinolone-resistant derivatives was observed. The susceptibilities of laboratory-adapted strains and clinical isolates to quinolones were tested by the microdilution method using FB. The MICs determined by microdilution were not significantly different from those determined by the agar dilution method recommended by the CLSI (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Moreover, the concentration-dependent time-kill of quinolones such as gatifloxacin and ciprofloxacin was observed in FB. At 2 to 4 times the MIC, gatifloxacin and ciprofloxacin were predominantly bactericidal against *N. gonorrhoeae* WHO A. At the MIC, the activities of both quinolones ranged from bactericidal to bacteriostatic. At 0.25 to 0.5 times the MIC, gonococcal growth was comparable to that of the growth control. These results suggest that the cultivation of *N. gonorrhoeae* by use of FB may be useful for evaluation of the antibacterial effects of quinolones.

Neisseria gonorrhoeae is one of the causatives of sexually transmitted diseases, and it is a fastidious organism. This organism is typically cultured using an agar medium such as chocolate agar plate (GCII agar base with 1% IsoVitaleX [BBL] and purified hemoglobin). The CLSI (formerly the National Committee for Clinical Laboratory Standards) recommends only the agar dilution procedure for antibacterial susceptibility testing of *N. gonorrhoeae* (20). Before the 1980s, a number of studies were published regarding the liquid culture methodology for *N. gonorrhoeae* (9, 13, 21, 23, 25). However, these reports demonstrated that the number of bacteria decreased rapidly after bacterial exponential growth, and broth microdilution methods for susceptibility testing of *N. gonorrhoeae* were reported to give higher MICs of β -lactam antibiotics against penicillinase-producing *N. gonorrhoeae* than agar dilution methods (7, 22).

Recently, the antibacterial activity of antigonococcal agents against clinical isolates of *N. gonorrhoeae* has been declining (1, 11, 24). Quinolones initially appeared to be promising agents for the treatment of *N. gonorrhoeae* infections; however, the extensive clinical use of quinolones carries the risk of the development of resistance, and indeed, there have been increasing numbers of recent isolates of *N. gonorrhoeae* that are highly resistant to quinolones, especially in Asia (11, 24, 27). Therefore, the evaluation of the antibacterial susceptibility of *N. gonorrhoeae* is important in the clinical setting. According to

the CLSI (formerly NCCLS) procedure, the drug susceptibility of *N. gonorrhoeae* should be measured by the agar dilution method, and it is recommended that direct colony suspension be used for the inoculum preparation for the susceptibility test of *N. gonorrhoeae* (20). However, these approaches are tedious, time-consuming, and inconvenient, especially in the investigation of the antimicrobial susceptibility of large numbers of isolates and of the activities of many antimicrobial agents. The broth microdilution method and the growth method using liquid culture for the inoculum preparation are both simple methods to test the susceptibilities of clinical isolates; however, they have not yet been established for testing the susceptibility of *N. gonorrhoeae*. To date, few studies have been reported regarding the susceptibilities of antibacterial-resistant *N. gonorrhoeae* to antigonococcal agents by use of the microdilution method (7, 22). Therefore, a more convenient procedure than the agar dilution procedure recommended by the CLSI (formerly NCCLS) is still needed.

In addition to its potential usefulness for susceptibility testing, a modified liquid culture methodology is necessary for conducting bactericidal studies of antibiotics, such as in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analysis. In vitro PK/PD analysis of antimicrobial agents offers an alternative method for the determination of an adequate clinical regimen and is useful for predicting the clinical efficacy of a given antibiotic against various bacteria (2, 6, 8, 14–16). Therefore, the in vitro PK model, which can simulate human PK, is rapidly becoming one of the most important examinations in the development of new antimicrobial agents. In order to simulate human PK in vitro, it is essential to use a liquid culture. In vitro PK/PD analysis for *N. gonorrhoeae* has not yet been performed,

* Corresponding author. Mailing address: Discovery Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd., 2399-1, Nogi, Shimotsuga, Tochigi 329-0114, Japan. Phone: 81-280-56-2201. Fax: 81-280-57-1293. E-mail: masaya.takei@mb.kyorin-pharm.co.jp.

TABLE 1. Strains used in this study

Strain	Mutation(s)	Source or reference
WHO A	Wild-type (parent)	26
R-4/5	<i>gyrA</i> (Ser91Phe)	26
R-8/1	<i>gyrA</i> (Asp95Tyr)	26
R-8/4	<i>gyrA</i> (Ser91Tyr)	26
R-8/5	<i>gyrA</i> (Asp95Asn)	26
R-4/5/1	<i>gyrA</i> (Ser91Phe), <i>parC</i> (Glu91Lys)	26
R-4/5/2	<i>gyrA</i> (Ser91Phe), <i>parC</i> (Asp86Asn)	26
R-4/5/3	<i>gyrA</i> (Ser91Phe)	26
ATCC49226	Wild-type (parent)	American Type Culture Collection
N-4-2	<i>gyrA</i> (Ser91Phe)	This study
N-4-2-4-2	<i>gyrA</i> (Ser91Phe), <i>parC</i> (Glu91Lys)	This study
TK106	<i>gyrA</i> (Ser91Phe), <i>parC</i> (Ser87Ile)	5
TK109	<i>gyrA</i> (Ser91Phe), <i>parC</i> (Ser87Ile)	5

because no liquid culture methodology has yet been established. Therefore, the development of such an approach remains necessary for in vitro PK/PD studies, as well as for testing the susceptibility of *N. gonorrhoeae*.

Cartwright et al. reported developing a fastidious broth (FB) that is capable of growing fastidious organisms (3). FB is used primarily for the recovery of clinically significant organisms from specimens. It is known that the viability of fastidious organisms, including *N. gonorrhoeae*, does not decline for several days in FB (3). However, thus far there has been no detailed report on the growth of *N. gonorrhoeae* in FB. In the present study, we examined the growth of *N. gonorrhoeae* in FB and considered whether or not FB could be used for the biological evaluation of *N. gonorrhoeae*, such as in vitro susceptibility testing and bactericidal activity of quinolones.

MATERIALS AND METHODS

Quinolones, bacterial strains, and media. The quinolones tested here were synthesized at Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokyo, Japan) or were purchased from commercial sources. Data on the bacterial strains used in this study are shown in Table 1. *N. gonorrhoeae* WHO A and its quinolone-resistant derivatives have been described previously (26). *N. gonorrhoeae* ATCC49226 was a quality control strain of the CLSI (formerly NCCLS), and its *gyrA* mutant (N4-2) and *gyrA parC* double mutant (N4-2-4-2) were obtained by selection with norfloxacin in the present study. Mutations of the quinolone resistance-determining region of *gyrA* and *parC* were determined following a previously described method (4). *N. gonorrhoeae* TK106 and TK109 are known to be quinolone-resistant clinical isolates, as reported previously (5). The clinical isolates used in this study were isolated from patients with gonococcal urethritis in Japan.

GCCII agar base medium (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) supplemented with 1% IsoVitalX (Becton Dickinson) and chocolate agar were used to prepare the inocula, determine the visible colony count, and confirm the presence of *N. gonorrhoeae* by the oxidase test. FB was prepared as described previously by Cartwright et al. (3), and consisted of 35 g of Columbia broth base, 5 g of glucose, 5 g of yeast extract, 2 g of neopeptone, and 0.75 g of agarose dissolved in 960 ml of distilled water. A total of 30 ml of hematin solution (0.05% [wt/vol] in 0.1 M NaOH) and 5 ml of Tween 80 (10% [vol/vol]) was then added, and the resultant broth was sterilized by autoclaving, after which 6 ml of pyridoxal solution (0.1% [wt/vol]) and 1.5 ml of NAD solution (1% [wt/vol]) were added.

Growth studies using FB. Colonies were removed from GCCII agar after 24 h of incubation at 35°C in a moist atmosphere containing 5% CO₂. The colonies were dispersed in sterile saline, and the inoculum turbidity was adjusted to approximately 1.0 at an optical density of 520 nm (ca. 10⁸ to 10⁹ CFU/ml). A total

of 100 µl of this suspension was transferred to test tubes containing 10 ml of FB. The final inoculum was approximately 10⁶ CFU/ml. Test tubes were incubated at 37°C in a water bath in the absence of CO₂ and were shaken at 100 rpm. Growth was monitored by determination of the viable count. Portions (0.1 ml) of the cultures were removed at the indicated time points and were plated onto drug-free GCCII agar supplemented with 1% IsoVitalX, after dilution as necessary. The numbers of colonies were counted after 24 h of incubation at 35°C in a moist atmosphere containing 5% CO₂.

Determination of MICs. The MICs were determined by agar dilution with GCCII agar supplemented with 1% IsoVitalX and by microdilution with FB.

The agar dilution procedure was identical to that recommended by the CLSI (formerly NCCLS) (20). The MIC was defined as the lowest concentration of an antibacterial agent that inhibited visible growth after incubation for 24 h at 35°C in a moist atmosphere containing 5% CO₂.

Microdilution plates were prepared using serial twofold dilutions of antimicrobial agents in FB. To prepare the inoculum, the turbidity of the actively growing FB culture was adjusted with sterile saline to obtain turbidity optically comparable to that of the 0.5 McFarland standard. The suspension was diluted 10-fold in sterile saline, and 5 µl of diluent was inoculated into 100 µl of FB. The final inoculum was approximately 5 × 10⁸ CFU/ml (ca. 5 × 10⁴ CFU/well). The plates were incubated for 24 h at 35°C in a moist atmosphere containing 5% CO₂. The MIC was defined as the lowest concentration of an antibacterial agent that prevented macroscopically visible growth under the test conditions.

Killing curve study. The bactericidal activities of gatifloxacin and ciprofloxacin were measured by a previously described method (10, 19) with minor modifications. In brief, representative strains incubated in FB for 24 h at 35°C in a moist atmosphere containing 5% CO₂ were diluted with fresh broth to approximately 10⁶ CFU/ml, and the diluted cultures were incubated for 2 h at 37°C in the absence of CO₂ with shaking. After 2 h of preincubation, gatifloxacin and ciprofloxacin were added to the culture at various concentrations around the MIC. Portions (0.1 ml) of the cultures were removed at the indicated time points and were plated onto drug-free GCCII agar supplemented with 1% IsoVitalX, after dilution as necessary. The numbers of colonies was counted after 24 h of incubation at 35°C in a moist atmosphere containing 5% CO₂.

In vitro PK model. The in vitro PK model has been described previously (6). A dilutional in vitro PK model (PASS-400; Dainipponseiki, Kyoto, Japan) was used to simulate serum concentrations of ciprofloxacin on the basis of the PK parameters reported previously (17). *N. gonorrhoeae* R-4/5/1, which possessed single-point mutations in the quinolone resistance-determining region of both *GyrA* (Ser91→Phe) and *ParC* (Glu91→Lys), were used. Representative strains incubated in FB for 24 h at 37°C with shaking were diluted with fresh broth to approximately 10⁶ CFU/ml, and the diluted cultures were incubated for 2 h at 37°C in the absence of CO₂ with shaking. After 2 h of preincubation, ciprofloxacin was then added to the culture chamber according to the dosing regimen. Aliquots of the cultures were collected via an outflow tube at the indicated time points and were plated onto drug-free GCCII agar supplemented with 1% IsoVitalX, after dilution as necessary. The number of colonies was counted after 24 h of incubation at 35°C in a moist atmosphere containing 5% CO₂.

RESULTS

Culture of *N. gonorrhoeae* by FB. The cultivation of *N. gonorrhoeae* was examined using FB. All of the tested strains of *N. gonorrhoeae* were found to be able to grow in FB (Fig. 1). *N. gonorrhoeae* WHO A (wild type) and its quinolone-resistant derivatives grew well in FB without any rapid decrease in the viable count after exponential growth. No significant changes in the growth rate were observed for the wild-type strain and its target-altered quinolone-resistant derivatives. The generation times for WHO A (wild type), R-4/5 (*gyrA*, Ser91→Phe), R-4/5/1 (*gyrA*, Ser91→Phe; *parC*, Glu91→Lys), R-4/5/2 (*gyrA*, Ser91→Phe; *parC*, Asp86→Asn), and R-4/5/3 (*gyrA*, Ser91→Phe; *parC*, unknown) were 83, 105, 94, 90, and 94 min, respectively. At 24 h after inoculation, the viable counts of the bacteria in culture had reached their maximum numbers, which ranged from 6 × 10⁸ to 9 × 10⁸ CFU/ml.

For *N. gonorrhoeae* ATCC49226 (wild type), which was the quality control strain recommended by the CLSI (formerly

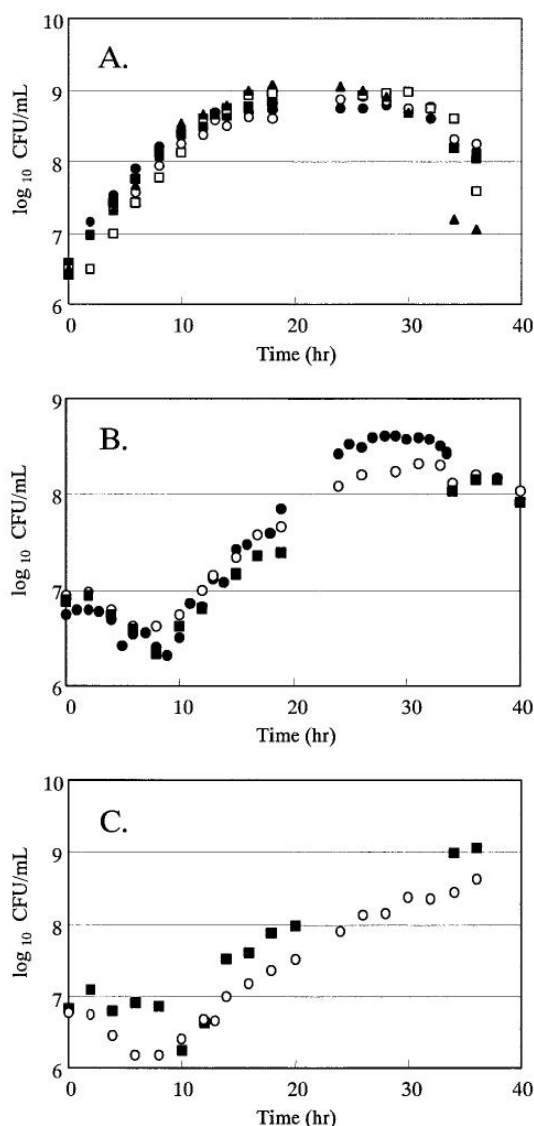


FIG. 1. Growth of *N. gonorrhoeae* strains, including quinolone-resistant strains, in FB. Symbols: A. ●, WHO A (wild type); ○, R-4/5 (*gyrA*); ■, R-4/5/1 (*gyrA parC*); □, R-4/5/2 (*gyrA parC*); ▲, R-4/5/3 (*gyrA*); B. ●, ATCC49226 (wild type); ○, N4-2 (*gyrA*); ■, N4-2-4-2 (*gyrA parC*); C. ■, TK106; ○, TK109 (quinolone-resistant clinical isolate).

NCCLS), and its target-altered quinolone-resistant derivatives, the exponential growth phase was observed for 15 h after a lag phase of 10 h. Maximal growth was observed 24 h after incubation with viable counts of approximately 4×10^8 CFU/ml. The generation time of the exponential phase of ATCC49226 (wild type), N4-2 (*gyrA*, Ser91→Phe), and N4-2-4-2 (*gyrA*, Ser91→Phe; *parC*, Asp86→Asn) were 127, 173, and 197 min, respectively.

Viable cells could be counted at 10 h after incubation for the clinical isolates of *N. gonorrhoeae* TK106 and TK109. The growth rates of these strains were the lowest among the strains tested, since their generation times were 222 min (TK106) and 215 min (TK109). The viable counts under the present culture conditions ranged from 4×10^8 (TK109) to 1×10^9 CFU/ml (TK106) at 36 h after inoculation.

Bacterial growth in FB was evaluated for the remaining 20 strains of *N. gonorrhoeae*, including laboratory-adapted strains and clinical isolates. One colony of each strain was then transferred into a tube containing 0.5 ml of FB and was then cultivated at 35°C in a moist atmosphere containing 5% CO₂. All tested strains were found to have grown to over 10⁸ CFU/ml at 24 h after inoculation. Additionally, *N. gonorrhoeae* ATCC49226 was found to have grown to over 10⁸ CFU/ml at a stationary phase after 10⁴, 10⁵, and 10⁶ CFU/ml inoculation (data not shown).

Comparison of the MICs of quinolones determined by microdilution and agar dilution procedures. No difference in the MICs of quinolones was observed by use of an agar dilution procedure using both direct colony suspension as recommended by the CLSI (formerly NCCLS) and FB culture for inoculum preparation (data not shown).

The MICs of quinolones used in this study are summarized in Table 2 to Table 4. The MICs of quinolones, as measured by the microdilution procedure using FB, were within a fourfold deviation, compared with those obtained by the agar dilution procedure. Additionally, the MICs of quinolones measured by the microdilution procedure for *N. gonorrhoeae* ATCC49226 were within the ranges permitted by the CLSI (formerly NCCLS) using the agar dilution procedure. Furthermore, the susceptibility to quinolones of target-altered quinolone-resistant strains was found to have decreased compared with that of the parent strains. Against clinical isolates, the MIC₅₀s and the MIC₉₀s obtained by the microdilution procedure were comparable to those observed with the agar dilution procedure. The percentage of agreement between the agar dilution procedure and microdilution procedure within a single doubling dilution exceeded 90% for all quinolones tested (Table 5).

Bactericidal activity of quinolones against *N. gonorrhoeae*. Killing curve studies were performed with gatifloxacin and ciprofloxacin against *N. gonorrhoeae* WHO A, and the bactericidal activities were found to increase with the concentrations of both gatifloxacin and ciprofloxacin (Fig. 2). More than 99% of the initial viable *N. gonorrhoeae* were killed within 2 to 4 h of incubation with quinolones at concentrations in excess of 2 × MIC. Bacteriostatic activity was observed at a concentration equal to the MIC.

Bacterial time-kill study using an in vitro simulation model. The time-kill curve for ciprofloxacin at the simulated serum concentration after oral dosing of 200 mg three times a day (t.i.d.), which is the Japanese clinical regimen, is shown in Fig. 3. The growth control curve demonstrated logarithmic growth to approximately 10⁹ CFU/ml. At a dose of 200 mg t.i.d., ciprofloxacin reduced the number of quinolone-resistant *N. gonorrhoeae* R-4/5/1 bacteria to below the limit of detection (<10² CFU/ml) within 8 h following the initial exposure. No regrowth was observed until 24 h after exposure.

TABLE 4. Comparative antimicrobial susceptibilities of *N. gonorrhoeae* clinical isolates (71 strains)

Antimicrobial agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
	Agar dilution			Microdilution		
	50%	90%	Range	50%	90%	Range
Norfloxacin	8	32	0.008–64	8	32	0.016–64
Ciprofloxacin	2	16	0.001–32	4	16	0.002–32
Ofloxacin	4	16	0.008–32	4	16	0.008–32
Levofloxacin	2	8	0.004–8	2	8	0.004–16
Gatifloxacin	0.5	2	0.002–2	0.5	2	0.002–2
Moxifloxacin	1	4	0.004–4	2	4	0.004–4
Sparfloxacin	1	4	0.001–8	2	8	0.001–16
Trovafoxacin	0.5	4	0.001–8	1	8	0.002–16
Garenoxacin	0.5	2	0.001–4	0.5	2	0.001–4
Gemifloxacin	0.5	2	0.001–4	0.5	4	0.001–8

all strains reached levels of more than 10^8 CFU/ml in FB. Therefore, it is possible that FB can be used to culture *N. gonorrhoeae* for various types of biological evaluation.

The evaluation of antibacterial agents, e.g., by in vitro PK/PD analysis, is performed based on the MICs. Therefore, the susceptibility of *N. gonorrhoeae* in FB would not be expected to differ substantially from that generally reported in the literature. Thus, the antibacterial susceptibilities determined by these microdilution procedures were compared with those determined by the agar dilution procedures recommended by the CLSI (formerly NCCLS). As regards the quality control strain of the CLSI (formerly NCCLS) (ATCC49226) and the laboratory-adapted strains used in this study, no significant differences were observed between the MICs obtained by either of the procedures. Additionally, the MIC₉₀s of quinolones against clinical isolates determined by microdilution were almost equal to or even twofold higher than those determined by agar dilution; moreover, the MICs associated with more than 90% of the clinical isolates tested were observed to be within only 1 doubling difference when the agar dilution and microdilution procedures were compared. As

TABLE 5. Agreement of microdilution with agar dilution for susceptibility testing of *N. gonorrhoeae*

Antimicrobial agent	% Deviation between MICs at dilution step:					
	-2	-1	0	+1	+2	+3
Norfloxacin		5.6	53.5	40.8		
Ciprofloxacin		2.8	54.9	40.8		1.4
Ofloxacin		4.2	53.5	42.3		
Levofloxacin		7.0	47.9	43.7		1.4
Gatifloxacin		14.1	54.9	31.0		
Moxifloxacin		9.9	50.7	35.2		4.2
Sparfloxacin		1.4	28.2	60.6		9.9
Trovafoxacin	1.4	9.9	29.6	54.9		4.2
Garenoxacin	5.6	16.9	42.3	35.2		
Gemifloxacin	1.4	9.9	28.2	57.7		2.8

regards various types of bacteria, including both laboratory-adapted strains and clinical isolates, the MICs of quinolones determined by both procedures were found differ slightly. It appears that such slight differences between the MICs are reflective of the standard deviation in this study. Therefore, the microdilution method may prove to be useful for the determination of the antibacterial activities of quinolones against *N. gonorrhoeae*, and the present culture method using FB could be applied for various types of evaluation of quinolone.

In Asia, the number of gonococcal infections caused by antibacterial-resistant strains has gradually increased since the mid-1990s. The rapid emergence of clinical isolates of *N. gonorrhoeae* with decreased susceptibility to quinolones has been reported previously (11, 24). In Hawaii, it was reported that a total of 10.4% of gonococcal isolates in 2000 were ciprofloxacin resistant, compared with <1.5% per year from 1990 to 1997 (12). In order to investigate this emerging quinolone resistance among clinical isolates of *N. gonorrhoeae*, it will be necessary to develop more expedient studies such as sequential resistance development and in vitro PK/PD analysis as well as time-kill studies, etc. Growth methods using a liquid medium offer several advantages over the more commonly used agar methods.

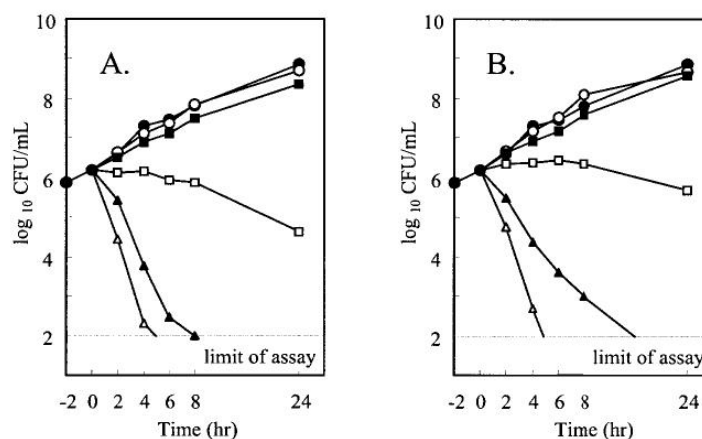


FIG. 2. Time-kill curves of gatifloxacin (panel A; MIC, 0.004 $\mu\text{g/ml}$) and ciprofloxacin (panel B; MIC, 0.004 $\mu\text{g/ml}$) against *N. gonorrhoeae* WHO A in FB. Symbols: ●, control; ○, 0.25 \times MIC; ■, 0.5 \times MIC; □, 1 \times MIC; ▲, 2 \times MIC; △, 4 \times MIC.

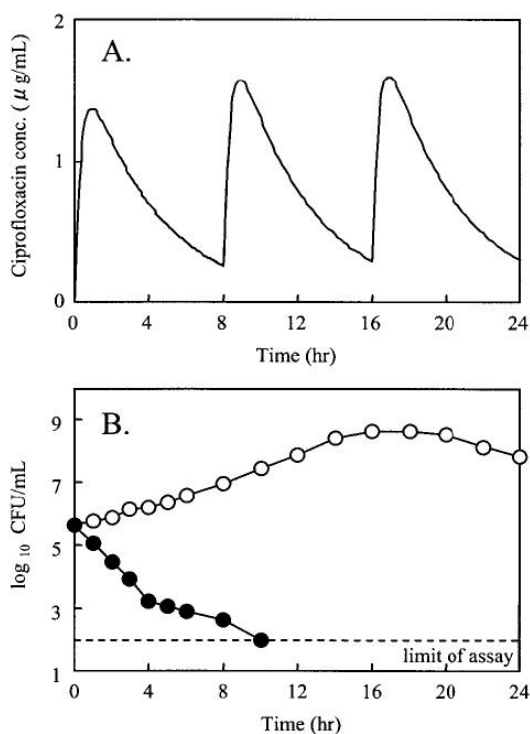


FIG. 3. Bactericidal effect of ciprofloxacin with a simulation concentration in serum at a dose of 200 mg t.i.d. on quinolone-resistant *N. gonorrhoeae* R-4/5/1 (A); MIC, 0.125 µg/ml (B). Symbols: ○, control; ●, 200 mg t.i.d. simulation.

Here, we performed time-kill kinetic studies of gatifloxacin and ciprofloxacin. These results indicated that both quinolones produced concentration-dependent killing effects over a 24-h period. At 2 to 4 × MIC, both compounds were predominantly bactericidal, and at the MIC, the activity ranged from bactericidal to bacteriostatic. At 0.25 to 0.5 × MIC, gonococcal growth was comparable to that of the growth control. Concentration-dependent time-kill was observed among the quinolones. These results suggest that the cultivation of *N. gonorrhoeae* in FB is useful for PK/PD analysis using an in vitro simulation model.

Unlike the United States regimen, that frequently used as the primary treatment for gonorrhea in Japan involves multiple and lower doses of quinolones, which results in the exposure of *N. gonorrhoeae* clinical strains to low concentrations of the agents. It has been suggested that the administration of large amounts of quinolones for clinical use will enhance the prevalence of quinolone resistance (11). However, the viable CFU counts of a genetically characterized quinolone-resistant strain (R-4/5/1) were reduced below the limit of detection by a simulated serum concentration after oral dosing of ciprofloxacin according to the Japanese clinical regimen (200 mg t.i.d.). These results contradict the present situation observed in the clinical setting in Japan.

Moran and Levine proposed "therapeutic time" as a pharmacodynamic parameter for the treatment of gonorrhea, whereby the therapeutic time was defined as the interval between the time the peak plasma concentration was reached and the time the plasma concentration dropped to less than four times the MIC₉₀ (18). According to that report, an effective gonococcal cure was expected when the value of the therapeutic time was 10 h or more according to all antimicrobial regimens, including the use of quinolones. The therapeutic time of the Japanese clinical regimen of ciprofloxacin against R-4/5/1 (MIC, 0.125 µg/ml) was 14.4 h. No discrepancy was observed between the prediction of the pharmacodynamic parameter (therapeutic time) and the results of the in vitro simulation model in this study. Therefore, in order to predict a clinical outcome, further detailed PK/PD analysis using an in vitro simulation model is still needed to determine the impact of the PK/PD parameters on bactericidal activity and resistance selectivity.

The use of in vitro PK/PD dynamic models using FB is likely to give the optimum pharmacodynamic parameters for the application of quinolone in the treatment of gonorrhea. It is hoped that such an approach will render it possible to propose an effective regimen of quinolones without risking increased microbial resistance.

REFERENCES

- Berrón, S., J. A. Vázquez, M. J. Giménez, L. de la Fuente, and L. Aguilar. 2000. In vitro susceptibilities of 400 Spanish isolates of *Neisseria gonorrhoeae* to gemifloxacin and 11 other antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2543–2544.
- Bowker, K. E., M. Wootton, C. A. Rogers, R. Lewis, H. A. Holt, and A. P. MacGowan. 1999. Comparison of in-vitro pharmacodynamics of once and twice daily ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 44:661–667.
- Cartwright, C. P., F. Stock, and V. J. Gill. 1994. Improved enrichment broth for cultivation of fastidious organisms. *J. Clin. Microbiol.* 32:1825–1826.
- Deguchi, T., M. Yasuda, M. Nakano, S. Ozeki, T. Ezaki, I. Saito, and Y. Kawada. 1996. Quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*: correlation of alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV with antimicrobial susceptibility profiles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1020–1023.
- Deguchi, T., I. Saito, M. Tanaka, K. Sato, K. Deguchi, M. Yasuda, M. Nakano, Y. Nishino, E. Kanematsu, S. Ozeki, and Y. Kawada. 1997. Fluoroquinolone treatment failure in gonorrhea. Emergence of a *Neisseria gonorrhoeae* strain with enhanced resistance to fluoroquinolones. *Sex. Transm. Dis.* 24:247–250.
- Ebisu, H., R. Kishii, M. Takei, and H. Fukuda. 2003. The effect of pharmacokinetic/ pharmacodynamic (PK/PD) parameters of gatifloxacin on its bactericidal activity and resistance selectivity against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Chemother.* 9:210–214.
- Geers, T. A., and A. M. Donabedian. 1989. Comparison of broth microdilution and agar dilution for susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:233–234.
- Gustafsson, I., E. Lowdin, I. Odenholt, and O. Cars. 2001. Pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters for antimicrobial effects of cefotaxime and amoxicillin in an in vitro kinetic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2436–2440.
- Hendry, A. T. 1983. Growth responses of *Neisseria gonorrhoeae* auxotypes to required amino acids and bases in liquid medium. *Can. J. Microbiol.* 29:1309–1313.
- Hosaka, M., T. Yasue, H. Fukuda, H. Tomizawa, H. Aoyama, and K. Hirai. 1992. In vitro and in vivo antibacterial activities of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2108–2117.
- Ito, M., M. Yasuda, S. Yokoi, S. Ito, Y. Takahashi, S. Ishihara, S. Maeda, and T. Deguchi. 2004. Remarkable increase in central Japan in 2001–2002 of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibility to penicillin, tetracycline, oral cephalosporins, and fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3185–3187.
- Iverson, C. J., S. A. Wang, M. V. Lee, R. G. Ohye, D. L. Trees, J. S. Knapp, P. V. Effler, N. P. O'Connor, and W. C. Levine. 2004. Fluoroquinolone resistance among *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Hawaii, 1990–2000: role of foreign importation and increasing endemic spread. *Sex. Transm. Dis.* 31:702–708.



A fully defined, clear and protein-free liquid medium permitting dense growth of *Neisseria gonorrhoeae* from very low inocula

Jeremy James Wade & Michelle Angela Graver

Health Protection Agency London Region Laboratory, Medical Microbiology, King's College Hospital, London, UK

Correspondence: Jim Wade, Health Protection Agency London Region Laboratory, Medical Microbiology, King's College Hospital, Denmark Hill, London SE5 9RS, UK. Tel.: +44 203 2993033; fax: +44 203 2993404; e-mail: jim.wade@kch.nhs.uk

Received 5 September 2006; revised 11 January 2007; accepted 20 April 2007.
First published online 7 June 2007.

DOI:10.1111/j.1574-6968.2007.00776.x

Editor: Bruce Ward

Keywords

Neisseria gonorrhoeae; chemically defined; liquid medium.

Abstract

Neisseria gonorrhoeae is difficult to cultivate in liquid medium. Currently there are no liquid media, defined or undefined, that reliably permit growth of this bacterium from low inocula. Standard clinical laboratory broths may allow multiplication of some strains of gonococci from large inocula, but such media incorporate infusates, extracts or digests and are therefore undefined. In this study, 20 gonococci of ten auxotypes were tested in various experimental media in the development of an easily prepared chemically defined, clear and protein-free liquid medium. The final medium – GW medium – allowed the growth of three clinical isolates of gonococci from inocula of $< 10^3$ CFU mL⁻¹ to $> 10^8$ CFU mL⁻¹ by 24 h. None of four commercially-available broths (nutrient broth, brain heart infusion, tryptone soya broth, and Mueller-Hinton broth) tested in parallel reliably supported growth of these isolates to the same extent. GW medium should be useful for studies of the growth of gonococci under different conditions and, as the medium is clear and colorless, this can be monitored turbidometrically. GW medium may be suitable as a basal medium for biochemical identification tests, antimicrobial susceptibility determinations and antimicrobial synergy studies.

Introduction

Neisseria gonorrhoeae is a fastidious bacterium, difficult to cultivate in liquid medium due to susceptibility to pH and divalent cation concentrations and a tendency to autolysis. Traditional broths (e.g. nutrient broth, tryptone soya broth, brain heart infusion etc.) may allow limited multiplication of *N. gonorrhoeae*, but typically require inocula in excess of 10^5 CFU mL⁻¹ to achieve dense growth consistently (Annera & Wild, 1982). Such broths incorporate infusates, extracts or digests and are therefore undefined. Chemically defined liquid media for *N. gonorrhoeae* are usually minimal media and none has been demonstrated to support the growth of low (e.g. $< 10^3$ CFU mL⁻¹) inocula (Welton *et al.*, 1944; Kenny *et al.*, 1967; Hunter & McVeigh, 1970; Bacigalupi & Lawson, 1973; Catlin, 1973; La Scolea & Young, 1974; Elmros *et al.*, 1976; Manchee *et al.*, 1980; Morse & Bartenstein, 1980; Wong *et al.*, 1980). Currently, therefore, there are no available liquid media, defined or undefined, that permit study of the growth of *N. gonorrhoeae* from low inocula (Reinhold *et al.*, 1988). This study sought to develop a chemically defined reference liquid medium that allows growth of *N. gonor-*

rhoeae from low inocula and is simple enough to prepare to ensure ease of use.

Materials and methods

In preliminary experiments, those auxotypes of *N. gonorrhoeae* most frequently recovered at King's College Hospital, London, were studied in various developmental liquid media. All strains had been recovered following direct inoculation of clinical material on to selective agar, were identified by standard procedures and stored at -70 °C. Auxotypes were determined by the method of Copley & Egglestone (1983) and denoted as nonrequiring (NR) or as a requirement for one or more of arginine (A); hypoxanthine (H); proline (P), ornithine (O) or uracil (U). The panel of strains tested included two representatives – distinguishable by serotyping using the Phadebact GC Serovar test (Boule Diagnostics AB, Sweden) – of each of the following auxotypes: PA, NR, P, AOU, PAOU, AH, A, AHU, H and PAH. The final medium – GW medium (Patent pending) – was made by preparing 1 L of normal strength M199 cell culture medium (commercially available with Earle's salts but without L-glutamine,

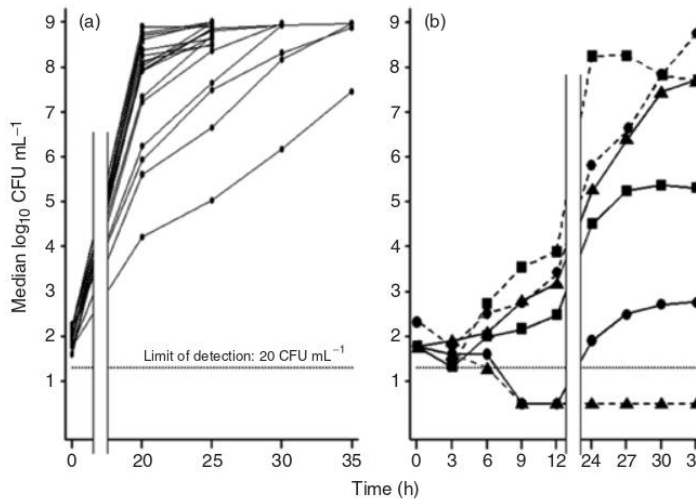


Fig. 1. (a) Growth of 20 strains of *Neisseria gonorrhoeae* in 50 mL GW medium in 5% CO₂ at 37 °C, agitated 100 r.p.m.; median values for triplicate experiments for each strain. For clarity, falling counts are not shown. (b) Growth of three clinical isolates of *N. gonorrhoeae* in BHI (▲—▲); MHB (△—△); NB (■—■); TSB (●—●); and GW medium (■—■); and of NCTC 8375 in GW medium (●—●).

phenol red or sodium bicarbonate; Sigma-Aldrich, Poole, UK) in distilled water. To this, 500 mL distilled water was added plus (g; molarity): glucose (10.0; 37 mM), ammonium bicarbonate (2.0; 17 mM), sodium acetate trihydrate (1.0; 4.9 mM), L-glutamine (0.75; 3.4 mM), spermidine (0.2; 919 µM), L-arginine (0.1; 383 µM), hypoxanthine (0.05; 245 µM), uracil (0.05; 298 µM), oxaloacetate (0.05; 252 µM), thiamine hydrochloride (0.05; 99 µM), L-ornithine (0.01; 39 µM), nicotinamide adenine dinucleotide (0.01; 10 µM) and sodium DL-lactate (2.5 mL of a 60% w/w syrup; 13 mM). Hypoxanthine and uracil were each dissolved in 2–3 mL 1 M NaOH. All reagents were from Sigma-Aldrich, Poole, UK. The pH was adjusted to 6.8 with 1 M HCl and the medium sterilized through a 0.22 µ filter. For each strain, overnight growth on chocolate agar (Oxoid, Basingstoke, UK) in 5% CO₂ at 37 °C was used to prepare a 0.5 McFarland suspension in phosphate-buffered saline (PBS; Sigma-Aldrich, Poole, UK). This was vortexed, further diluted 10⁻³ in PBS, vortexed again and 50 µL inoculated in to 50 mL of GW medium in 150 mL acid-washed glass Erlenmeyer flasks. These were agitated, loosely capped, at 100 r.p.m. in 5% CO₂ at 37 °C. Counts were performed on chocolate agar using a spiral plater (Don Whitley, UK) at times 0, 20, 25, 30 and 35 h on neat or serial 10⁻² dilutions in PBS, vortexed for 5 s. This experiment was performed in triplicate using different batches of medium. In a second experiment, using identical inocula, volumes and conditions, three fresh clinical isolates were inoculated in to brain heart infusion (BHI), Mueller–Hinton broth (MHB), tryptone soya broth (TSB) and nutrient broth (NB; all Oxoid, UK) and GW medium; *N. gonorrhoeae* NCTC 8375 was also inoculated in to GW medium. Samples were taken at 0, 3, 6, 12, 24, 27, 30 and 33 h and diluted and counted as described above. The

clinical isolates appeared epidemiologically distinct (one from primary care and the others from different clinics), had different colonial morphologies and were not of the same antibiogram.

Results

Results are shown in Fig. 1. In the first experiment (Fig. 1a), 2, 11, 3 and 4 strains achieved their maximum counts at 20, 25, 30 and 35 h, respectively. Microscopic examination of aliquots taken at different times revealed bacteria with normal morphology and Gram stain appearance, with no clumping. In the second experiment (Fig. 1b), each of the three fresh clinical isolates grew rapidly in GW medium with similar growth curves: the range of counts at 24 h was 1.63×10^8 – 1.93×10^8 CFU mL⁻¹. In contrast, none of the commercially-available broths supported growth of all three clinical isolates to the same extent: 24 h counts (CFU mL⁻¹) were 2.4×10^2 – 2.48×10^7 for BHI; < 20 – 1.8×10^5 for TSB; and 1.14×10^4 – 3.94×10^4 for NB. MHB did not permit multiplication of any isolate.

Discussion

Chemically defined media originally designed for nutritional studies can be complicated to prepare and use, often requiring preparation of multiple solutions (Catlin, 1973; La Scolea & Young, 1974; Manchee *et al.*, 1980; Morse & Bartenstein, 1980); preincubation in CO₂ (La Scolea & Young, 1974); bubbling through with CO₂ (Kenny *et al.*, 1967; Catlin, 1973), or continuous culture in a fermentor (La Scolea & Young, 1974). M199 cell culture medium has been used as a component of liquid (Kenny *et al.*, 1967; Bacigalupi & Lawson, 1973), biphasic (Elmros *et al.*, 1976) and solid

(Kenny *et al.*, 1972) media for *N. gonorrhoeae* and may have a stabilizing effect (Elmros *et al.*, 1976). It was found that M199 at two-thirds strength as a base medium, rather than neat (Kenny *et al.*, 1967) or half strength (Bacigalupi & Lawson, 1973), gave superior growth. GW medium is not a minimal medium and additive weights have been rounded-up for simplicity. The 10 auxotypes included in the panel of strains in this study represent c. 90% of strains encountered locally. Like other workers, it was found that not all strains required all components of the medium for maximal growth and variability in growth rate was observed once recognized nutritional requirements were satisfied. For example, a PAOU auxotype and an NR auxotype achieved maximum growth at 20 and 35 h, respectively; the AHU auxotypes behaved similarly (presumably reflecting their clonal origin); a high concentration of thiamine was important for their growth in liquid medium. There are limitations to this study. Firstly, the panel of strains is relatively small; they are local isolates and may not be representative. Secondly, although dilutions were vortexed throughout (and clumping not noted on microscopy) it has been assumed that one colony on chocolate agar is the product of one bacterium. Undoubtedly, however, inocula of this study were very low. Thirdly, although the bacteria in our inocula were not washed – and there is therefore the potential for carry-over of nutrients from chocolate agar despite substantial dilution – it can be envisaged that this is how the medium is likely to be used. GW medium could be useful for those undertaking studies of the growth of *N. gonorrhoeae* under different conditions. As the medium is clear and colorless, growth can be monitored turbidometrically. It can be recommended that sampling at 0, 10 and 25 h in preliminary studies will permit workers to determine whether strains under study are fast growers (i.e. maximum growth at 25 h or thereabouts) or not. Sampling times for subsequent substantive experiments can then be selected. Although the NCTC strain is relatively slow-growing, its growth curve (Fig. 1b) may be used for quality-control purposes. Because of the defined nature of GW medium, the demonstration (e.g. by MS) of molecules present in inoculated GW medium, but absent in uninoculated medium, confirms that these are bacterial products. The medium is also suitable for growing *N. gonorrhoeae* to high density to harvest bacterial cell components. It is conceivable that, as GW medium is protein free, it would be suitable for vaccine preparation. Results confirm that standard clinical laboratory broths do not reliably permit the growth of *N. gonorrhoeae* from low inocula and, when growth does occur, it is not as profuse as in GW medium and may be insufficient to produce visible turbidity. Although *N. gonorrhoeae* is infrequently recovered from sterile fluids (e.g. joint aspirates) by enrichment alone, this may reflect the poor performance of traditional liquid media rather than the absence of this bacterium in low numbers (Reinhold *et al.*, 1988). It is


intended to determine whether GW medium supplemented with selective antibacterials has a role in the primary isolation of *N. gonorrhoeae* from genital specimens. An inability to grow *N. gonorrhoeae* reliably in liquid media has resulted in a reliance on growth-independent identification tests (i.e. detection of preformed enzymes) and agar incorporation for antimicrobial susceptibility testing. It is feasible that GW medium could be used as a base medium in biochemical identification tests and for minimum inhibitory concentration determinations or synergy testing.

References

- Annera DI & Wild B (1982) Growth of *Neisseria gonorrhoeae* in brain heart infusion. *J Clin Pathol* **35**: 118–119.
- Bacigalupi BA & Lawson JW (1973) Defined physiological conditions for the induction of the L-form of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* **116**: 778–784.
- Catlin BW (1973) Nutritional profiles of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, and *Neisseria lactamica* in chemically defined media and the use of growth requirements for gonococcal typing. *J Infect Dis* **128**: 178–194.
- Copley CG & Egglestone SI (1983) Auxotyping of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in the United Kingdom. *J Med Microbiol* **16**: 295–302.
- Elmros T, Burman LG & Bloom GD (1976) Autolysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* **126**: 969–976.
- Hunter KM & McVeigh I (1970) Development of a chemically defined medium for growth of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antonie van Leeuwenhoek* **36**: 305–316.
- Kenny CP, Ashton FE, Diena BB & Greenberg L (1967) A chemically defined protein-free liquid medium for the cultivation of some species of *Neisseria*. *Bull World Health Org* **37**: 569–573.
- Kenny CP, Diena BB, Wallace R & Greenberg L (1972) Cultivation and properties of *Neisseria* sp. grown in chemically defined media. *Can J Microbiol* **18**: 1087–1090.
- La Scolea LJ & Young FE (1974) Development of a defined minimal medium for the growth of *Neisseria gonorrhoeae*. *Appl Microbiol* **28**: 70–76.
- Manchee RJ, Wiblin CN & Robinson A (1980) Growth of *Neisseria gonorrhoeae* in continuous culture. *FEMS Microbiol Lett* **7**: 115–118.
- Morse SA & Bartenstein L (1980) Purine metabolism in *Neisseria gonorrhoeae*: the requirement for hypoxanthine. *Can J Microbiol* **26**: 13–20.
- Reinhold CE, Nicholai DJ, Piccinini TE, Bayford BA, York MK & Brooks GF (1988) Evaluation of broth media for routine culture of cerebrospinal and joint fluid specimens. *Am J Clin Pathol* **89**: 671–674.
- Welton JP, Stockinger HE & Carpentier CM (1944) A chemically defined medium for the cultivation of the gonococcus. *Science* **99**: 372.
- Wong TP, Shockley RK & Johnston KH (1980) WSJM, a simple chemically-defined medium for growth of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* **11**: 363–369.

Article

Novel Whole-Cell Inactivated *Neisseria Gonorrhoeae* Microparticles as Vaccine Formulation in Microneedle-Based Transdermal Immunization

Rikhav P. Gala ¹, Rokon Uz Zaman ¹, Martin J. D'Souza ¹ and Susu M. Zughaier ^{2,*} 

¹ Vaccine Nanotechnology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Mercer University, Atlanta, GA 30341, USA; rikhav.praful.gala@gmail.com (R.P.G.); rokonuz.zaman@live.mercer.edu (R.U.Z.); DSOUZA_MJ@mercerc.edu (M.J.D.)

² Department of Basic Medical Sciences, College of Medicine, Qatar University, Doha 2713, Qatar

* Correspondence: szughaier@qu.edu.qa; Tel.: +974-4403-7859-12461

Received: 22 July 2018; Accepted: 27 August 2018; Published: 4 September 2018



Abstract: *Neisseria gonorrhoeae* is a strict human pathogen responsible for more than 100 million new sexually transmitted infections worldwide each year. Due to the global emergence of antibiotic resistance, the Center for Disease control (CDC) recently listed *N. gonorrhoeae* as an urgent threat to public health. No vaccine is available in spite of the huge disease burden and the possibility of untreatable gonorrhea. The aim of this study is to investigate the immunogenicity of a novel whole-cell-based inactivated gonococcal microparticle vaccine formulation loaded in dissolvable microneedles for transdermal administration. The nanotechnology-based vaccine formulation consists of inactivated whole-cell gonococci strain CDC-F62, spray dried and encapsulated into biodegradable cross-linked albumin matrix with sustained slow antigen release. The dry vaccine nanoparticles were then loaded in a dissolvable microneedle skin patch for transdermal delivery. The efficacy of the whole-cell microparticles vaccine formulation loaded in microneedles was assessed in vitro using dendritic cells and macrophages as well as in vivo mouse model. Antibody titers were measured using an enzyme immunosorbent assay (ELISA) and antigen-specific T lymphocytes were assessed in spleens and lymph nodes. Here we report that whole-cell-based gonococcal microparticle vaccine loaded in dissolvable microneedles for transdermal administration induced significant increase in antigen-specific IgG antibody titers and antigen-specific CD4 and CD8 T lymphocytes in mice compared to gonococcal antigens in solution or empty microneedles. Significant increase in antigen-specific IgG antibody levels was observed at the end of week 2 in groups that received the vaccine compared to the group receiving empty nanoparticles. The advantages of using formalin-fixed whole-cell gonococci that all immunogenic epitopes are covered and preserved from degradation. The spherical shaped micro and nanoparticles are biological mimics of gonococci, therefore present to the immune system as invaders but without the ability to suppress adaptive immunity. In conclusion, the transdermal delivery of microparticles vaccine via a microneedle patch was shown to be an effective system for vaccine delivery. The novel gonorrhea nanovaccine is cheap to produce in a stable dry powder and can be delivered in microneedle skin patch obviating the need for needle use or the cold chain.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*; gonorrhea; vaccine; microneedle; skin patch; nanotechnology; antigen-specific antibody; antigen-specific CD4 T lymphocytes

1. Introduction

Neisseria gonorrhoeae is strictly a human pathogen that causes sexually transmitted infection. The disease state termed gonorrhea accounts for >100 million cases worldwide each year. The gonococcus

(GC) is noted for its capacity to develop resistance to antibiotics used in therapy [1,2]. The gonococcus can survive extracellularly and intracellularly, however, in both environments, the bacteria must adapt to pressures exerted by the host [3,4]. There were over 400,000 reported cases in the US in 2015, and several more that are not reported [1,2,5]. The disease state termed gonorrhoea accounts for >100 million cases worldwide each year. There were over 460,000 reported cases in the US in 2016, and several more that are not reported. It is much more common in Africa and other developing nations [6]. Untreated gonococcal infection in women may progress to pelvic inflammatory disease, increasing the risk of ectopic pregnancy and infertility [7]. Currently, there are no vaccines for gonorrhoeae. The main reason to warrant the development of a gonococcal vaccine is the emergence of antibiotic-resistant GC, which has led to a rapid increase in the prevalence of the infections since 2012 [8]. With the development of antibiotic-resistant strains of *N. gonorrhoeae*, the Food and Drugs Administration (FDA) and CDC have listed the research and development of a vaccine against gonorrhoea as a high priority.

To date, no FDA-approved vaccine against gonorrhoea is available in spite of the huge burden of disease [9–11]. Only two vaccines for *N. gonorrhoeae* have entered into clinical trials in the past. The first was a crude, killed whole-cell vaccine, which was studied in a controlled experiment in a population of Inuit in northern Canada with high incidence and prevalence of *N. gonorrhoeae* infection [12,13]. There was no evidence for protection, even though the vaccine was said to be well tolerated. Although the vaccine induced an antibody response in over 90% of vaccine recipients it lacked the generation of an adaptive immune response which led to the failure of the vaccine study [14]. *N. gonorrhoeae* can interact with various immune cells to elicit innate inflammatory responses and suppress T helper cell Th1/Th2-mediated specific immune responses [15]. Phagocytosis by macrophages results in the activation of NLRP3 inflammasomes, the production of IL-1 β , activation of polymorphonuclear neutrophils (PMNs), and activation of cathepsin B, which leads to pyroptosis of antigen presenting cells (APCs) [16]. Interactions with dendritic cells (DCs) lead to up-regulation of PDL-1 and PDL-2, which induce apoptosis of cells bearing PD-1. This up-regulation also causes the release of IL-10, which has immunoregulatory properties and stimulates type-1 regulatory T cells (Treg1) [15]. Interaction with CD4⁺ T helper cells induces secretion of IL-10, TGF- β , and IL-6 [17]. Activation of Treg1 cells by IL-10 and TGF- β leads to suppression of Th1 and Th2 cells. TGF- β and IL-6 drive the development of Th17 cells, which secrete IL-17 and IL-22, leading to the recruitment or induction of innate defenses such as PMNs and anti-microbial peptides [18]. *N. gonorrhoeae* evades the immune system by PMNs and anti-microbial peptides while concomitantly suppressing the development of adaptive immune responses such as *N. gonorrhoeae*-specific antibodies that could enhance phagocytosis and intracellular clearance of gonococci by phagocytes and bacteriolysis through the classical complement pathway [4,9,19].

We developed a novel nanotechnology-based vaccine formulation consisting of formalin fixed whole-cell *N. gonorrhoeae* as the vaccine antigen encapsulated in biodegradable microparticles loaded in microneedles for transdermal administration. The nanotechnology-based vaccine formulations enhance immune responses by slowly releasing antigens and thereby, act as antigen depot. The advantages of using formalin fixed whole-cell gonococci that all immunogenic epitopes are covered and preserved from degradation; the spherical shaped micro and nanoparticles are biological mimics of gonococci, therefore present to the immune system as invaders but without the ability to suppress adaptive immunity; and less toxicity due to lower antigen loading (10%) in nanoparticles. Here we report that the gonococcal nanovaccine formulation enhanced antibody response and induced antigen-specific CD4 and CD8 T lymphocyte in mice vaccinated with gonococcal nanoparticles loaded in microneedles compared to mice vaccinated subcutaneously with gonococcal antigens in solution or empty microneedles.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of the *N. gonorrhoeae* Vaccine Antigen

N. gonorrhoeae strain CDC-F62 was grown from freezer stock on Gonococcal Base (GCB) agar containing defined Supplement I and II under 5.0% CO₂ at 37 °C as described [3,4]. Palliated colonies were selected and further subcultured on a GCB agar plate overnight. The fresh growth of piliated colonies was used to inoculate two flasks each containing 300 mL of GCB broth containing defined Supplement I and II with sodium bicarbonate (0.043%) in a 1000 mL sterile flask. The starting OD₆₀₀~0.2 and the flasks were incubated in a water bath with shaking at 37 °C till late mid-log growth phase i.e., when OD₆₀₀ reached~0.5. The growth of gonococci was stopped by the addition of 10% formalin (*v/v*) and left to mix with gentle shaking overnight at room temperature. The formalin-fixed gonococcal pellets were harvested by centrifugation at 5000 × *g* for 15 min at 4 °C. The harvested pellets were washed three times with 45 mL of sterile PBS and centrifuged as above. The final collected pellets were pooled and vortexed thoroughly and saved as a very dense suspension at −80 °C till further use to formulate into vaccines. The particulates were prepared as previously described method established by our laboratory using the Buchi Mini Spray Dryer B-290 [20,21]. These biodegradable particles were characterized for their surface morphology, size, charge, and yield.

2.2. Preparation of the *N. gonorrhoeae* Vaccine Loaded Microparticles

The biodegradable microparticles were prepared following a method previously developed in our vaccine nanotechnology laboratory at Mercer University using the Buchi Mini Spray Dryer B-191 [20–28]. Briefly, for a batch of 100 mg of vaccine microparticles at 1% antigen loading, 10 mg of the formalin-fixed whole-cell of *N. gonorrhoeae* (5 mL of 2 mg/mL stock solution) and 90 mg of pre-cross-linked bovine serum albumin (BSA) were mixed. Pre-cross-linked BSA solution was prepared by dissolving 90 mg BSA in 5 mL DI water in a 50 mL beaker. Once BSA is dissolved, glutaraldehyde (25% in DI water purchased from Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) was added at 200 µL for every 1 gm of BSA and kept stirring at 300 rpm overnight in a dark place at room temperature. Excess glutaraldehyde was neutralized with sodium bisulphate (10 mg). At this point, the formalin-fixed whole-cell of *N. gonorrhoeae* was added to the pre-cross-linked BSA prepared overnight. 100 mg of this prepared formulation was dissolved in 10 mL of DI water. This formulation was spray dried through a 0.5 mm nozzle (nozzle temperature: −5 °C). The inlet temperature was 120 °C with the aspirator at 100% and a flow rate of 20 mL/h to obtain the *N. gonorrhoeae* vaccine microparticles.

2.3. Microparticle Recovery Yield

Recovery yield of the microparticles after spray drying was calculated for all the batches formulated [27–29]. Percent recovery yield was evaluated using the following formula (1):

$$\text{Percentage Recovery Yield (\%)} = \frac{\text{The weight of microparticles after spray drying} \times 100}{\text{The weight of all ingredients before spray drying}} \quad (1)$$

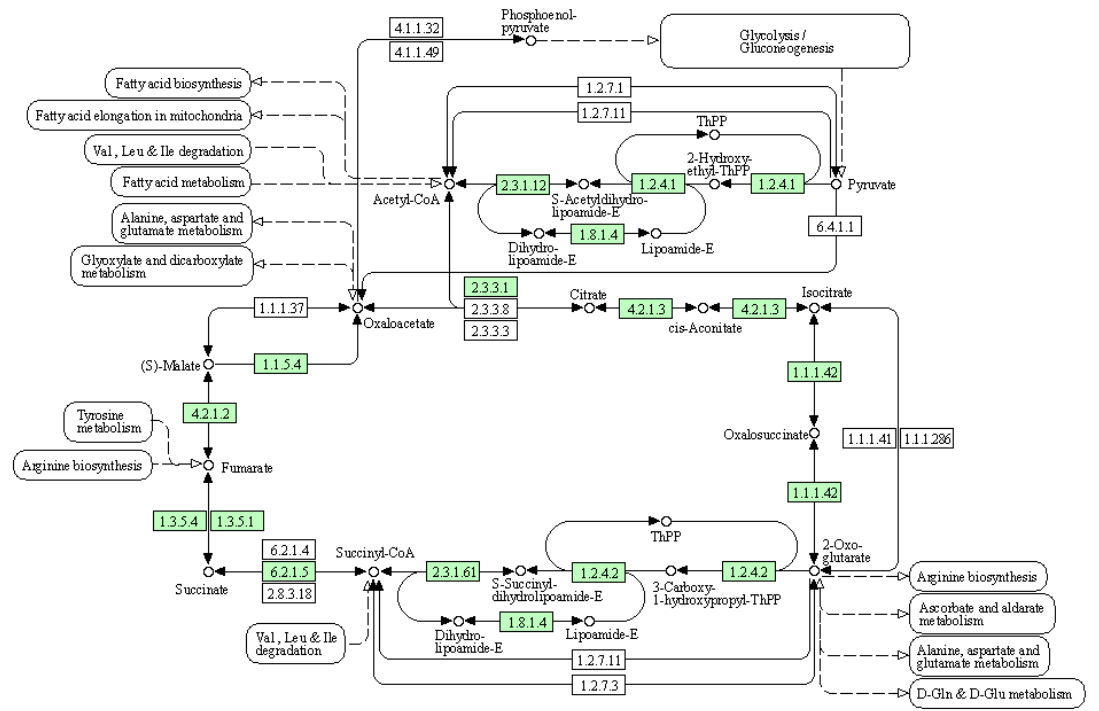
2.4. Particle Size Distribution

The particle size of the optimized formulation was evaluated using the Spectrex Laser Particle Counter that works on the principle of laser diffraction as previously described [21,30]. Briefly, two mg of the particles were suspended in 1 mL of deionized water, vortexed well, vortexed well for 2 min, and then analyzed by laser diffraction on the particle counter. Particle size was measured in triplicate for empty as well as antigen-loaded particles and contrasted.

2.5. Zeta Potential Measurement

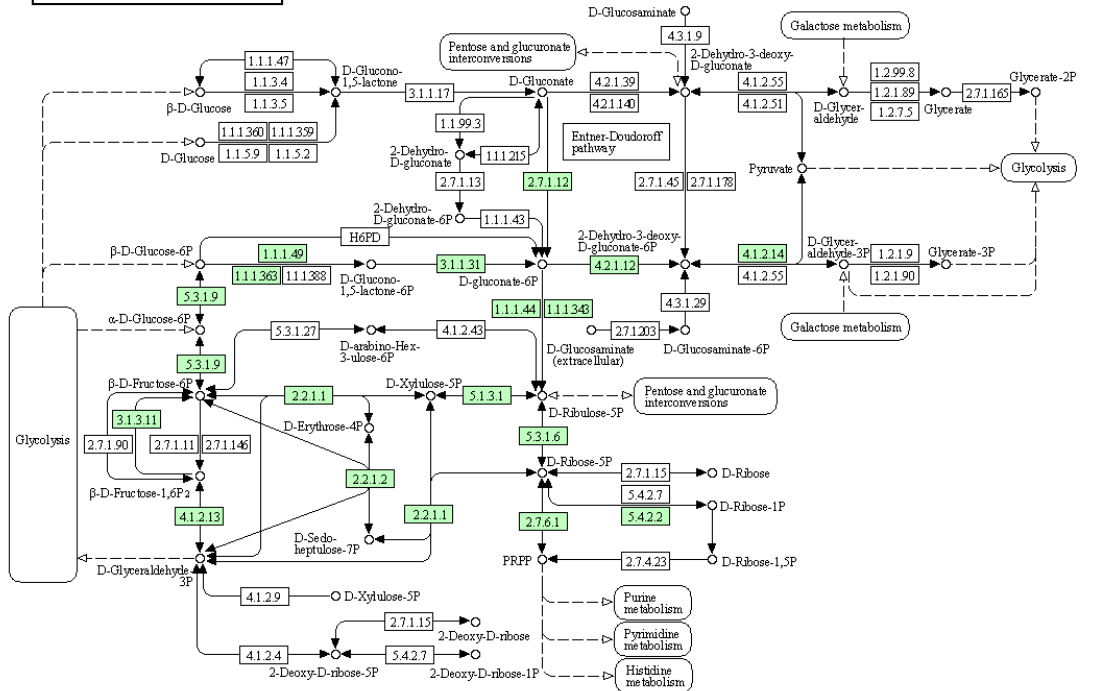
Five micrograms of microparticles were suspended in 1 mL of deionized water, transferred to a zeta potential measurement cuvette, and measured using a Malvern Zetasizer. Zeta potential

CITRATE CYCLE (TCA CYCLE)



00020 6/7/18
 (c) Kanehisa Laboratories

PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY



00030 6/26/18
 (c) Kanehisa Laboratories

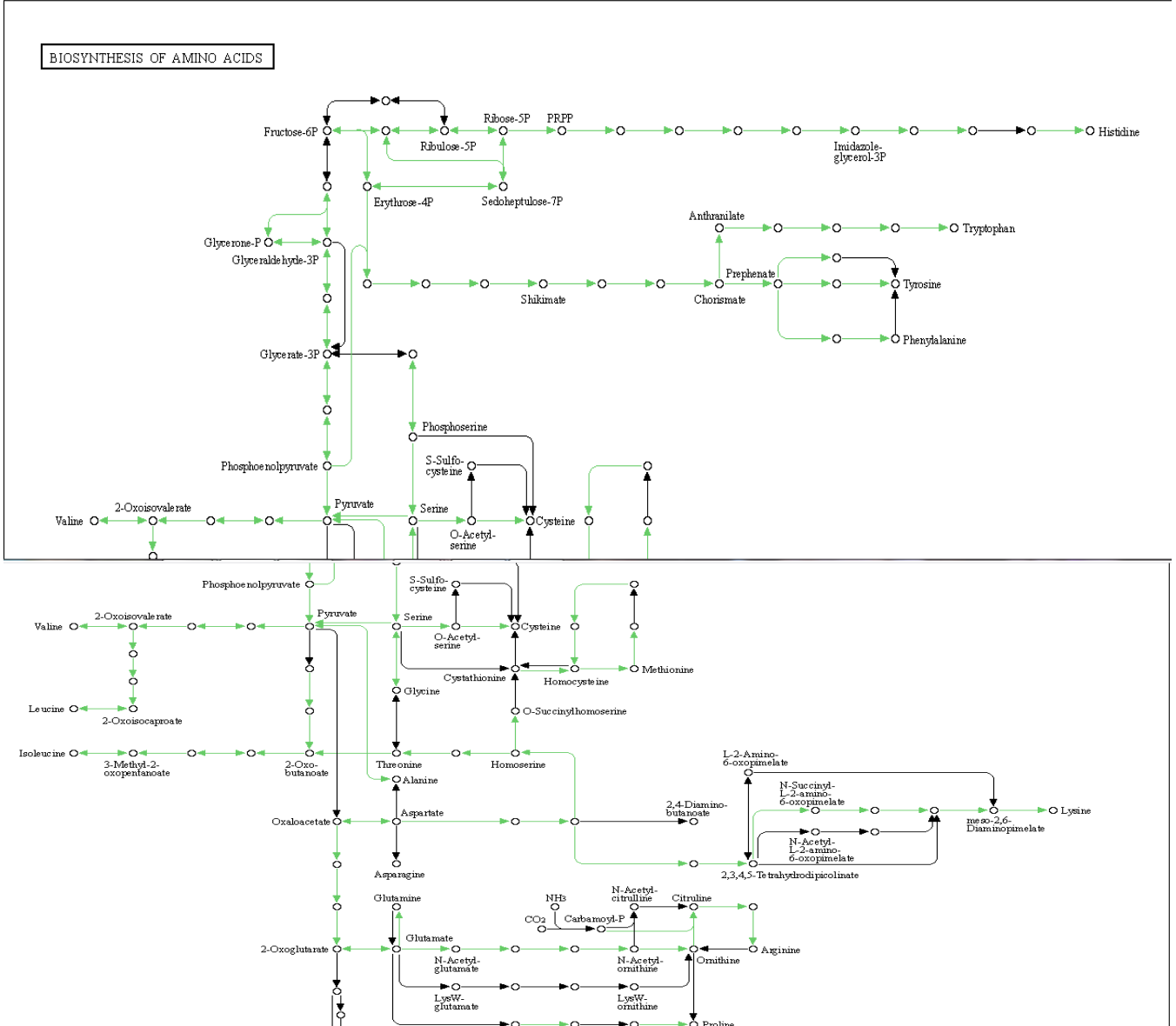


Схема біосинтезу препарату на основі біомаси бактерій *Neisseria gonorrhoeae* починаючи з реакцій катаболізму ростового субстрату - манітолу

