



# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код і назва)

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

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і  
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 04 ” квітня 20 22 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧКИ

САЛІМОВОЇ Євгенії Гусейнівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Культивування *Bordetella pertussis* для виробництва компоненту проти кашлюку вакцини АКДП

керівник роботи СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна, к.б.н., доц.,  
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 30 березня 2022 року № 164-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.06.2022

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Bordetella pertussis*, цільовий продукт: кашлюковий анатоксин, об'єм ферментера: 10 л, коефіцієнт заповнення ферментера: 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми. РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема одержання компонента проти кашлюку вакцини АКДП – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема одержання компонента проти кашлюку вакцини АКДП – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 04 квітня 2022 року

**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	04.04.2022 – 11.04.2022	Виконано
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	11.04.2022 – 20.04.2022	Виконано
3	Техніко-економічне обґрунтування	20.04.2022 – 27.04.2022	Виконано
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	27.04.2022 – 2.05.2022	Виконано
5	Специфікація обладнання	2.05.2022 – 6.05.2022	Виконано
6	Опис технологічної схеми	6.05.2022 – 13.05.2022	Виконано
7	Контроль виробництва	13.05.2022 – 20.05.2022	Виконано
8	Оформлення пояснювальної записки	20.05.2022 – 26.05.2022	Виконано
9	Виконання графічної частини проекту	26.05.2022 – 1.06.2022	Виконано

Здобувачка \_\_\_\_\_  
(підпис)

Євгенія САЛІМОВА  
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи \_\_\_\_\_  
(підпис)

Оксана СКРОЦЬКА  
(ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Дипломний проект присвячений розробці технології виробництва компоненту проти кашлюку вакцини АКДП з використанням бактерій *Bordetella pertussis* Tohama I. На середовищі з глутаматом натрію можливо синтезувати 0,0225 г/л цільового продукту. Відповідно до розрахунків ТЕО річна потужність виробництва компоненту проти кашлюку складає 3 мг/рік.

Технологічна схема біосинтезу кашлюкового токсину включає допоміжні роботи (підготовку аераційного повітря, підготовка розчину фосфорної кислоти для стабілізації рН середовища, підготовка запасних розчинів, підготовка поживного середовища) та технологічний процес (стадія вирощування посівного матеріалу та виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10 л з коефіцієнтом заповнення 0,6).

Дипломний проект викладений на 89 сторінок друкованого тексту, містить 10 таблиць, 18 рисунків і складається з вступу, семи розділів, списку використаної літератури (57 джерел) та графічної частини (2 креслення формату А1).

**Ключові слова:** кашлюковий токсин, *B. pertussis* Tohama I, вакцини, біосинтез, анатоксин.

## ЗМІСТ

<b>РЕФЕРАТ.....</b>	<b>4</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>7</b>
<b>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....</b>	<b>10</b>
<b>РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....</b>	<b>15</b>
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	15
2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	26
2.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	30
<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....</b>	<b>31</b>
3.1. Потреба у цільовому продукті.....	31
3.2. Розрахунок потужності виробництва.....	32
3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	33
3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	33
<b>РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....</b>	<b>36</b>
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу..	36
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера.....	34
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря.....	39
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	42
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища...49	
<b>РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....</b>	<b>53</b>
<b>РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....</b>	<b>57</b>
<b>РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....</b>	<b>65</b>
7.1. Мікробіологічний контроль.....	71
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	75
7.2.1. Концентрація біомаси.....	75

7.2.2. Концентрація цільового продукту.....	76
7.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	79
<b>ЛІТЕРАТУРА.....</b>	<b>83</b>



хвороби, так і після щеплення [3].

Кашлюк – це інфекційна хвороба, що є основною причиною дитячої захворюваності та смертності. Проте її можна попередити за допомогою вакцин. Останніми роками почали знову реєструвати випадки захворюваності на кашлюк, і було докладено багато зусиль задля виявлення можливих причин повернення хвороби. Основними з них є неоптимальна ефективність наявних вакцин, а також обмежена тривалість їхньої дії. Існує багато чинників, які впливають на клінічні особливості патології: попередня імунізація чи інфекція, вік пацієнта, стать і лікування антибіотиками. Швидке та своєчасне виявлення кашлюку має головне значення для належного лікування й попередження його ускладнень, особливо у дітей. Однак із клінічної точки зору кашлюк доволі важко діагностувати. Належне лікування допоможе зменшити тривалість і тяжкість кашлю; найважливішими ліками в цьому випадку є макролідні антибіотики [4].

Кашлюк все ще залишається патологією світового значення. Його особливість заключається в еволюції: на відміну від багатьох інших інфекційних захворювань, наразі існує багато форм і клінічних ознак кашлюку, від типових до дуже складних. І хоча своєчасна діагностика й ефективна терапія є вагомими факторами для боротьби з кашлюком, лише завдяки поширенню вакцинації можливо зменшити циркуляцію *Bordetella pertussis* [4].

Існує два типи вакцин проти кашлюку: цільноклітинні, що були винайдені в 1940-х роках і застосовуються й на сьогодні, особливо у країнах з низьким і середнім рівнями прибутків; і менш реактогенні безклітинні, чи ацелюлярні вакцини, ліцензовані з середини 1990-х років минулого сторіччя [5].

**Актуальність:** організація виробництва кашлюкового анатоксину в Україні завжди буде актуальною задля попередження розвитку епідемії захворювання та збереження життя населення.

**Новизна:** використання вакцинного штаму бактерій *Bordetella pertussis* Tohama I, який характеризується вищою концентрацією кашлюкового токсину (0,0225 г/л), меншою його вартістю і дешевшим поживним середовищем порівняно з іншими штамами.

## РОЗДІЛ 1

### ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

З метою одержання кашлюкового токсину (КТ) – складової ацелюлярної (безклітинної) вакцини проти кашлюку – культивують грам-негативні бактерії *Bordetella pertussis*.

**Хімічні властивості.** Кашлюковий токсин (інші назви – лімфоцитозостимулювальний фактор, гістамінсенсibiliзувальний фактор, протективний антиген [6]) – це термостабільний токсин (інактивація за 80°C), що належить до АДФ-рибозилтрансфераз – ферментів, котрі після проникнення до клітини відщеплюють нікотинамід від НАД, приєднуючи залишок аденозиндифосфорибози до білків-мішеней. Він складається з двох основних субодиниць: А-протомера, що відповідає за токсичність і утворюється з субодиниці S1, і В-олігомера, що допомагає токсину прикріплюватися до клітин-мішеней і утворюється з субодиниць S2-S5 [7]. Структурну формулу КТ наведено на рис. 1.1. Його молярна маса становить 105 кДа [8].



Рис. 1.1. Структура кашлюкового токсину [8]

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.34 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ доцм.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Салімова Е.Г.</i>			<i>РОЗДІЛ 1. Характеристика цільового продукту</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Скороцька О.І.</i>					<i>10</i>	<i>89</i>
<i>Консультант</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>						<i>10</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						

**Дія на організм людини.** КТ – основний фактор вірулентності *B. pertussis* - володіє різноманітною біологічною активністю. Він складається з 5 структурних субодиниць (S1-S5), пронумерованих за зменшенням молекулярної маси й об'єднаних в А-В структуру. Частина А, що відповідає субодиниці S1, має ферментативну активність і каталізує АДФ-рибозилування трансдуцину (мембранного білку клітини-мішені), котрий є частиною системи, що інгібує клітинну аденілатциклазу. Порушення роботи аденілатциклази призводить до накопичення цАМФ, і це стає на заваді нормальному функціонуванню клітин-мішеней. Частина В, яка складається з субодиниць S2-S5, відповідає за приєднання токсину до рецепторів клітин-мішеней. Наявність мутацій в субодиницях S2 і S3 призводить до зміни кількості утворюваного КТ та його цитотоксичної дії на клітини. Виділення КТ контролюється системою *ptl* (*pertussis toxin liberation*), яка складається з 9 генів, що відповідають за остаточну побудову й секрецію токсину. Пошкодження циліарного епітелію й синтез фактору некрозу пухлин, що відбувається за участю КТ, сприяє колонізації респіраторного тракту. В-субодиниця КТ взаємодіє з Т-клітинним рецептором, опосередковуючи Т-клітинну проліферацію, продукцію ІЛ-2, ІФН-гамма, фактору некрозу пухлин. Основною мішенню для КТ є легеневі макрофаги. Останні разом із тучними клітинами здатні фагоцитувати *B.pertussis*, відіграючи важливу роль у кліренсі бактерій, які колонізують епітелій дихальних шляхів. У відповідь на вторгнення кашлюкової палички не лише макрофаги, але й тучні клітини синтезують цитокіни – фактор некрозу пухлин та ІЛ-6. КТ з одного боку знижував продукцію ФНО- $\alpha$  та ІЛ-6 тучними клітинами, а з іншого - блокував синтез протизапального інтерлейкіну ІЛ-10, не впливаючи на виділення ІЛ-4. ІЛ-4 та ІЛ-10 посилюють гуморальні й зменшують клітинні імунні реакції. Ранній синтез ІЛ-4 не завжди перешкоджає розвитку клітинної відповіді за Th1-типом. Саме такий тип імунної відповіді розвивається після аерогенного зараження *B.pertussis* *in vivo* та сприяє санації дихальних шляхів. ІЛ-4, який утворився в ранні терміни, бере участь в активації

місцевого вироблення прозапальних цитокінів тучними клітинами у відповідь на інфекцію, викликану паличками Борде-Жангу [9].

КТ індукує не лише антигенспецифічні клітини Th1 типу, але одночасно й Th2. Головним біологічним ефектом КТ є лейко- та лімфоцитоз. Особливо виражений вплив КТ на популяцію Т-лімфоцитів за рахунок зв'язування його з CD3-рецепторами. Ці зміни поєднуються з активацією В-лімфоцитів. Одночасно змінюється здатність лімфоцитів до рециркуляції та вторгненню їх у лімфоїдні органи, що пояснює лімфоцитоз при захворюванні на кашлюк [9].

**Синтез кашлюкового токсину.** Наразі даний токсин отримують лише шляхом біологічного синтезу. Застосований у медичній практиці КТ являє собою очищений від баластних білків і знезаражений фотолізом, формаліном і теплом екзотоксин *B. pertussis*, сорбований на гелі гідроксиду алюмінію. Методів хімічного синтезу КТ не виявлено [7].

**Сфери застосування.** Знешкоджений кашлюковий токсин (анатоксин) входить до складу безклітинної вакцини проти кашлюку. Людям роблять щеплення згідно з графіком вакцинації з метою профілактики цього захворювання [7].

Розглянемо застосування кашлюкового токсину в медичній практиці на прикладі препарату «Інфанрикс» – комбінованої ацелюлярної очищеної інактивованої рідкої вакцини для профілактики дифтерії, правця та кашлюку.

***Склад препарату:***

одна доза (0,5 мл) містить:

- ***діючі речовини:*** дифтерійний анатоксин – не менше 30 МО; правцевий анатоксин – не менше 40 МО; детоксикований кашлюковий анатоксин (КТ) – 25 мкг; філаментозний гемаглютинін (ФГА) - 25 мкг; пертактин (PRN) – 8 мкг.
- ***допоміжні речовини:*** алюмінію гідроксид, натрію хлорид та вода для ін'єкцій.

***Лікарська форма.*** Суспензія для ін'єкцій.

**Основні фізико-хімічні властивості:** мутна рідина, повільно осідаючи, утворює білий осад. Безбарвний супернатант.

#### ***Фармакотерапевтична група***

Бактеріальні вакцини. Код АТС J07AJ52.

#### ***Імунологічні та біологічні властивості***

##### **Фармакодинаміка**

Імунна реакція після первинної імунізації вакциною ІНФАНРИКС™

Через один місяць після 3-дозового курсу первинної вакцинації, проведеної у перші 6 місяців життя більш ніж 99% немовлят, вакцинованих ІНФАНРИКС™, мали титри антитіл більші за 0,1 МО/мл як для дифтерії, так і для правця. Вакцина містить кашлюкові антигени (КТ, ФГА і пертактин), що відіграють важливу роль у формуванні специфічного імунітету проти кашлюку. Імунна відповідь на ці антигени була більше, ніж у 95% цих дітей (за даними клінічних випробувань).

Імунна реакція після бустерної вакцинації вакциною ІНФАНРИКС™

Після введення бустерної дози ІНФАНРИКС™ на другому році життя (13 - 24 місяці) всі раніше вакциновані немовлята мали титри антитіл більші за 0,1 МО/мл як для дифтерії, так і для правця. Імунна відповідь на кашлюкові антигени була більше, ніж у 96% цих дітей.

##### **Фармакокінетика**

Оцінка фармакокінетичних властивостей не є обов'язковою для вакцин.

#### ***Клінічні характеристики***

##### **Показання.**

Активна первинна імунізація проти дифтерії, правця і кашлюку у дітей віком від 2 місяців. Вакцина ІНФАНРИКС™ показана також у вигляді бустерної дози для дітей, які раніше були імунізовані трьома або чотирма дозами вакцини для профілактики дифтерії, правця та кашлюку з ацелюлярним (АаКДП) або з цілюклетинним (АКДП) кашлюковим компонентом.

##### **Протипоказання.**

Вакцину ІНФАНРИКС™ не слід призначати особам з відомою гіперчутливістю до будь-якого компоненту вакцини або особам, у яких виникли ознаки гіперчутливості після попереднього введення вакцини ІНФАНРИКС™ або вакцини для профілактики дифтерії, правця і кашлюку з цільноклітинними компонентами.

Вакцина ІНФАНРИКС™ протипоказана для щеплення дітей, у яких виникла енцефалопатія невідомої етіології протягом 7 днів, після попереднього щеплення вакциною, що містила кашлюковий компонент. У цьому випадку курс вакцинації слід продовжити вакциною з дифтерійним і правцевими компонентами [10].



Рис. 1.2. Препарат Інфанрикс [10]

## РОЗДІЛ 2

# ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

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

У 1930-х роках стали доступними вакцини АКДП, а в 1940-х їхнє використання стало звичайною справою для США [11]. 1957 року в Англії та Уельсі вперше почали застосовувати цільноклітинні вакцини проти кашлюку, і кількість повідомлень про нові випадки захворювань значно знизилась [12]; у Китаї – з 1960-х років [13], в Нідерландах – з 1950-х [14]. В Україні щеплення такою вакциною почали проводити з 1956 року в Києві. Спочатку використовували моновакцину, а пізніше кашлюковий компонент став складовою вакцини АКДП. З 1960 року імунізацію проти кашлюку було запроваджено в кожному українському місті [15]. Оскільки післявакцинальні реакції з боку нервової системи були пов'язані з кашлюковою складовою, було створено також вакцини з ацелюлярним кашлюковим компонентом (АаКДП), тобто безклітинні вакцини. У 1980-х роках їх почали застосовувати в Японії, а 1997 року – в США [11, 16].

Єдиним продуцентом кашлюкового компоненту є бактерія *Bordetella pertussis*. Зазвичай при проведенні досліджень аналізують протективну (захисну) активність вакцин, виготовлених на основі різних штамів цього прокаріота – головну характеристику антигенів або ж кількість виділеного кашлюкового токсину. Відповідно штами з найбільшою активністю або з найбільшим виходом кашлюкового токсину надалі можна застосовувати для виробництва вакцин. Зараз використовують обидва типи вакцин: і цільноклітинні, і безклітинні (ацелюлярні).

У таблиці 2.1. наведено особливості культивування декількох штамів *Bordetella pertussis* на поживних середовищах різного складу.

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.34 КР ПЗ</b>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ доким.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Архівів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Салімова Е.Г.</i>						15	89
<i>Перевір.</i>	<i>Скроцька О.І.</i>							
<i>Консультант</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							
						<b>Кафедра БТМ</b>		15

## Особливості одержання кашлюкового токсину на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація продукту, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Bordetella pertussis</i> WWE	Глутамат натрію	10,7	48	0,00449	Культивування в колбах зі 100 мл середовища на качалці (t = 35°C, n = 200 об/хв)	Buasri W., Boonchird C., Prompiboon P., Panbangred W., Petre J., Impoonsup A. et al. Construction of <i>Bordetella pertussis</i> strains with enhanced production of genetically-inactivated Pertussis Toxin and Pertactin by unmarked allelic exchange. <i>BMC Microbiology</i> . 2012, 12(1): 1-17. doi: 10.1186/1471-2180-12
	Пролін	0,24				
	NaCl	2,5				
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5				
	KCl	0,2				
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1				
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,02				
	Трис(гідроксиметил)амінометан	6,1				
	Казамінокислоти	10				
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01				
	Цистеїн	0,04				
	Глутатіон	0,1				
	Аскорбінова кислота	0,02				
Ніацин	0,004					
Диметил-β-циклодекстрин	1					

## Продовження табл. 2.1.

<i>Bordetella pertussis Tohama I</i>	Пролін	1,04	39	0,0225	Культивування в колбах зі 100 мл середовища на качалці (t = 35°C, n = 150 об/хв); pH = 7,2	Branco dos S., Olivier B.G., Boele J, Smessaert V., De Rop P., Krumpochova P. et al. Probing the genome-scale metabolic landscape of <i>Bordetella pertussis</i> , the causative agent of whooping cough. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 2017, 83(21): 1-45. doi:10.1128/AEM.01528-17
	Глутамат натрію	20				
	Гідрохлорид цистеїну	0,04				
	NaCl	2,5				
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5				
	KCl	0,2				
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1				
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,02				
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01				
	Трис(гідроксиметил)амінометан	6,1				
	Аскорбінова кислота	0,4				
	Глутатіон	0,15				
	Ніацин	0,004				
	Диметил – β – циклодекстрин	1				
	Аланін	0,312				
	Аспарагінова кислота	0,436				
	Глутамінова кислота	1,6				
	Гістидин	0,188				
	Гліцин	0,163				
	Ізолейцин	0,288				
Лейцин	0,484					
Гідрохлорид лізину	0,6					
Метіонін	0,156					
Фенілаланін	0,25					
Серин	0,23					
Тирозин	0,067					
Валін	0,456					

## Продовження таблиці 2.1

<i>Bordetella pertussis</i> WWC	Глутамат натрію	10,7	48	0,00316	Культивування в колбах зі 100 мл середовища на качалці (t = 35°C, n = 200 об/хв)	Pat. 9187754B2 USA. Modified <i>Bordetella pertussis</i> strains / Boonchird C., Buasri W., Panbangred W., Petre J. Publ. 17.11.2015.
	Пролін	0,24				
	NaCl	2,5				
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5				
	KCl	0,2				
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1				
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,02				
	Трис	6,1				
	Казамінокислоти	0,5				
	Диметил – β – циклодекстрин	1				
	Бактоагар	15				
	Гідрохлорид цистеїну	0,04				
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01				
	Аскорбінова кислота	0,02				
Ніацин	0,004					
Глутатіон	0,15					

Закінчення табл. 2.1.

<i>Bordetella pertussis</i> 509	Бактоказамінокислоти	12	30	0,0027	Культивування у засівному бутлі зі 100 мл середовища на роторному шейкері (t = 35°C, n = 200 об/хв)	Moradtalab H., Noofeli M., Zeighami H., Haghi F. Evaluation of Pertussis Toxin Expression in B2 and THJS Media. <i>Archives of Razi Institute</i> . 2019, 74(1): 59-67. doi:10.22092/ari.2018.110249.1124
	Глутамінова кислота	10				
	NaCl	5				
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1				
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2				
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3				
	Розчинний крохмаль	3				
	Дріжджовий екстракт	4				
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02				
	CuSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,001				
Глутатіон	0,02					
<i>Bordetella pertussis</i> 134	Бактоказамінокислоти	180	36	0,01233	Культивування в колбах із 400 мл середовища на качалці (t = 35°C, n = 140 об/хв, pH = 7,8-8,2)	Shivanandappa K.C., Jagannathan S., Pandiyarajan S., Tamilvanan P., Umadevi T., Kalaiselvan J. et al. Purification of heat labile toxin from <i>Bordetella pertussis</i> vaccine strain 134 employed indigenous technology. <i>Alexandria Journal of Medicine</i> . 2016, 52(4): 107-113. doi: <a href="https://doi.org/10.1016/j.ajme.2015.06.001">https://doi.org/10.1016/j.ajme.2015.06.001</a>
	Глутамінова кислота	30				
	NaCl	15				
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3				
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,6				
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,06				
	Розчинний крохмаль	90				
	Дріжджовий екстракт	30				
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0748				
	CuSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,003				
Глутатіон	0,061					

При виборі біологічного агента необхідно враховувати концентрацію цільового продукту, склад і вартість поживного середовища, а також тривалість культивування. Проаналізувавши дані, наведені в таблиці 2.1., можна зробити висновок, що найбільш високий показник концентрації цільового продукту має штам *Bordetella pertussis* Tohama I (0,0225 г/л). Трохи нижчий показник у *Bordetella pertussis* 134 (0,01233 г/л). Ще меншу концентрацію цільового продукту отримаємо за використання штамів *Bordetella pertussis* WWE, *Bordetella pertussis* 509 і *Bordetella pertussis* WWC (0,00449, 0,0027 і 0,00316 г/л відповідно).

Тривалість культивування штаму *Bordetella pertussis* Tohama I становить 39 годин, *Bordetella pertussis* WWE та *Bordetella pertussis* WWC потрібно культивувати протягом 48 годин, *Bordetella pertussis* 134 росте за 36 годин, а *Bordetella pertussis* 509 вирощуватимемо 30 годин.

Наступним етапом є вибір поживного середовища для культивування бактерій *Bordetella pertussis* Tohama I, зважаючи на вартість компонентів (табл. 2.2).

Таблиця 2.2.

### Вартість різних поживних середовищ для культивування *Bordetella pertussis* Tohama I

Назва поживного середовища	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1,2,3)*
1	2	3	4	5	6
MSS-CDM	Пролін	1,04	860	0,8944	1
	Глутамат натрію	20	75	1,5	2
	Гідрохлорид цистеїну	0,04	710	0,0284	3
	NaCl	2,5	3,40	0,0085	4
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	49	0,0245	5
	KCl	0,2	19	0,0038	6
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1	48	0,0048	7
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,02	27	0,00054	8
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01	25	0,00025	9
	Трис (гідроксиметил)-амінометан	6,1	1646	10,0406	10
	Аскорбінова кислота	0,4	245	0,098	11
	Глутатіон	0,15	3 566,06	0,534909	12

	Ніацин	0,004	200	0,0008	13
	Диметил-β-циклодекстрин	1	111 575,50	111,5755	14
	Аланін	0,312	429,65	0,134051	15
	Аспарагінова кислота	0,436	360	0,15696	16
	Глутамінова кислота	1,6	80	0,128	17
	Гістидин	0,188	2000	0,376	18
	Гліцин	0,163	150	0,02445	19
	Ізолейцин	0,288	670	0,19296	20
	Лейцин	0,484	502,12	0,243026	21
	Гідрохлорид лізину	0,6	69	0,0414	22
	Метіонін	0,156	100	0,0156	23
	Фенілаланін	0,25	1087	0,27175	24
	Серин	0,23	1900	0,437	25
	Тирозин	0,067	1800	0,1206	26
	Валін	0,456	145	0,06612	27
	<b>Вартість 1 л середовища – 126,92 грн</b>				
IMP-CDM	Пролін	0,882	860	0,75852	1
	Глутамат натрію	18,667	75	1,400025	2
	Гідрохлорид цистеїну	0,004	710	0,00284	3
	NaCl	0,073	3,40	0,000248	4
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	49	0,0245	5
	KCl	0,2	19	0,0038	6
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1	48	0,0048	7
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,02	27	0,00054	8
	Fe(III)-цитрат·3H <sub>2</sub> O	0,02	1245,55	0,024911	28
	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,00128	360	0,000461	29
	CoCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,00042	500	0,00021	30
	ZnCl <sub>2</sub>	0,01	50	0,0005	31
	MOPS	2,5	53765,2	134,413	32
	Аскорбінова кислота	0,623	245	0,152635	11
	Глутатіон	0,233	3 566,06	0,830892	12
	Ніацин	0,006	200	0,0012	13
	Диметил-β-циклодекстрин	1	111 575,50	111,5755	14
	Ацетат натрію	0,409	30	0,01227	33
	Аланін	0,304	429,65	0,130614	15
	Аспарагінова кислота	0,524	360	0,18864	16
	Глутамінова кислота	3,475	80	0,278	17
	Гістидин	0,032	2000	0,064	18
Гліцин	0,149	150	0,02235	19	
Ізолейцин	0,244	670	0,16348	20	
Лейцин	0,438	502,12	0,219929	21	
Гідрохлорид лізину	0,393	69	0,027117	22	

	Метіонін	0,116	100	0,0116	23
	Фенілаланін	0,234	1087	0,254358	24
	Серин	0,187	1900	0,3553	25
	Тирозин	0,034	1800	0,0612	26
	Валін	0,399	145	0,057855	27
	Гідрохлорид тіаміну	0,01	1880	0,0188	34
	Біотин	0,0002	2160	0,000432	35
	Рибофлавін	0,0003	780	0,000234	36
	Пантотенат кальцію	0,004	1871,10	0,007484	37
<b>Вартість 1 л середовища – 251,07 грн</b>					
IMP2-CDM	Пролін	0,882	860	0,75852	1
	Глутамат натрію	18,667	75	1,400025	2
	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,00283	15	0,00004245	38
	NaCl	0,073	3,40	0,000248	4
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	49	0,0245	5
	KCl	0,2	19	0,0038	6
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1	48	0,0048	7
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,02	27	0,00054	8
	Fe(III)-цитрат·3H <sub>2</sub> O	0,02	1245,55	0,024911	28
	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,00128	360	0,000461	29
	CoCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,00042	500	0,00021	30
	ZnCl <sub>2</sub>	0,01	50	0,0005	31
	MOPS	2,5	53765,2	134,413	32
	Аскорбінова кислота	0,623	245	0,152635	11
	Глутатіон	0,233	3 566,06	0,830892	12
	Ніацин	0,006	200	0,0012	13
	Диметил-β-циклодекстрин	1	111 575,50	111,5755	14
	Ацетат натрію	0,409	30	0,01227	33
	Аланін	0,304	429,65	0,130614	15
	Аспарагінова кислота	0,524	360	0,18864	16
	Глутамінова кислота	3,475	80	0,278	17
	Гістидин	0,032	2000	0,064	18
	Гліцин	0,149	150	0,02235	19
	Ізолейцин	0,244	670	0,16348	20
	Лейцин	0,438	502,12	0,219929	21
	Гідрохлорид лізину	0,393	69	0,027117	22
	Метіонін	0,116	100	0,0116	23
	Фенілаланін	0,234	1087	0,254358	24
	Серин	0,187	1900	0,3553	25
	Тирозин	0,034	1800	0,0612	26
	Валін	0,399	145	0,057855	27
Гідрохлорид тіаміну	0,01	1880	0,0188	34	
Біотин	0,0002	2160	0,000432	35	

	Рибофлавін	0,0003	780	0,000234	36
	Пантотенат кальцію	0,004	1871,10	0,007484	37
<b>Вартість 1 л середовища – 251,07 грн</b>					
IMP2-CDM (концентрація амінокислот така як у середовищі MSS-CDM)	Пролін	1,04	860	0,8944	1
	Глутамат натрію	18,667	75	1,400025	2
	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,00283	15	0,00004245	38
	NaCl	0,073	3,40	0,000248	4
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	49	0,0245	5
	KCl	0,2	19	0,0038	6
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1	48	0,0048	7
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,02	27	0,00054	8
	Fe(III)-цитрат·3H <sub>2</sub> O	0,02	1245,55	0,024911	28
	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,00128	360	0,000461	29
	CoCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,00042	500	0,00021	30
	ZnCl <sub>2</sub>	0,01	50	0,0005	31
	MOPS	2,5	53765,2	134,413	32
	Аскорбінова кислота	0,623	245	0,152635	11
	Глутатіон	0,233	3 566,06	0,830892	12
	Ніацин	0,006	200	0,0012	13
	Диметил-β-циклодекстрин	1	111 575,50	111,5755	14
	Ацетат натрію	0,409	30	0,01227	33
	Аланін	0,312	429,65	0,134051	15
	Аспарагінова кислота	0,436	360	0,15696	16
	Глутамінова кислота	3,475	80	0,278	17
	Гістидин	0,188	2000	0,376	18
	Гліцин	0,163	150	0,02445	19
	Ізолейцин	0,288	670	0,19296	20
	Лейцин	0,484	502,12	0,243026	21
	Гідрохлорид лізину	0,6	69	0,0414	22
	Метіонін	0,156	100	0,0156	23
	Фенілаланін	0,25	1087	0,27175	24
	Серин	0,23	1900	0,437	25
	Тирозин	0,067	1800	0,1206	26
Валін	0,456	145	0,06612	27	
Гідрохлорид тіаміну	0,01	1880	0,0188	34	
Біотин	0,0002	2160	0,000432	35	
Рибофлавін	0,0003	780	0,000234	36	
Пантотенат кальцію	0,004	1871,10	0,007484	37	
<b>Вартість 1 л середовища – 251,72 грн</b>					

**Примітка.** \* - Ціни наведено станом на травень 2021 р. 1 - <https://prom.ua/p617648188-prolin-pro-100g.html?> 2 - <https://prom.ua/p1284277641-glutamnat-natriya-1kg.html?> 3 -

<https://prom.ua/p617661207-tsistein-gidrohlorid-cys.html?> 4 - [https://snabhim.com.ua/sol-pishhevaya?gclid=EAIaIQobChMI8eDEm7Dg8AIVvgSiAx1nDAYrEAQYAiABEGKlxPD\\_BwE](https://snabhim.com.ua/sol-pishhevaya?gclid=EAIaIQobChMI8eDEm7Dg8AIVvgSiAx1nDAYrEAQYAiABEGKlxPD_BwE) 5 -  
<https://prom.ua/p1059869951-monofosfat-kaliya.html?> 6 - <https://prom.ua/p1068708486-hlorid-kaliya.html?> 7 - <https://klebrig.com.ua/p1274951694-magnij-hloristyj-1kg.html> 8 -  
<https://prom.ua/p148481371-kaltsij-hloristyj-hlorid.html> 9 - [https://prom.ua/p1023243012-zhelezo-  
sernokisloe-zheleznyj.html?&primelead=Mt4wNA](https://prom.ua/p1023243012-zhelezo-sernokisloe-zheleznyj.html?&primelead=Mt4wNA) 10 - <https://prom.ua/p877092328-tris-1kg.html> 11 -  
<https://prom.ua/p272635184-askorbinovaya-kislota-vitamin.html?&primelead=MS41Mg> 12 -  
[https://russian.alibaba.com/product-detail/factory-supply-l-glutathione-powder-bulk-pure-glutathione-  
60755937687.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal\\_offer.d\\_title.30365907uSuhtO](https://russian.alibaba.com/product-detail/factory-supply-l-glutathione-powder-bulk-pure-glutathione-60755937687.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.30365907uSuhtO) 13 -  
[https://prom.ua/p561896171-niatsin-vitamin-  
ili.html?utm\\_source=google\\_pla&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=cpc\\_08\\_09\\_selskoe\\_hozyajstvo&utm\\_term=%7Bkeyword%7D&gclid=EAIaIQobChMI5suL0bng8AIVEcgYCh2DgwwMEAYYASABEGKliPD\\_BwE](https://prom.ua/p561896171-niatsin-vitamin-ili.html?utm_source=google_pla&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=cpc_08_09_selskoe_hozyajstvo&utm_term=%7Bkeyword%7D&gclid=EAIaIQobChMI5suL0bng8AIVEcgYCh2DgwwMEAYYASABEGKliPD_BwE) 14 - <https://chemline.ru/catalog/cyclodextrins/metil-beta-tsiklodekstrin/>  
15 - <https://prom.ua/p1310539042-alanin-alfa-chda.html?> 16 - [https://prom.ua/p505512416-  
asparaginovaya-kislota-farm.html?&primelead=MS4wOQ](https://prom.ua/p505512416-asparaginovaya-kislota-farm.html?&primelead=MS4wOQ) 17 - [https://prom.ua/p1412627076-  
glutaminovaya-kislota.html?](https://prom.ua/p1412627076-glutaminovaya-kislota.html?) 18 - <https://prom.ua/p871224288-gistidin.html> 19 -  
<https://snabhim.kharkov.ua/p983040122-glitsin-farm-aminouksusnaya.html> 20 -  
<https://kiev.flagma.ua/uk/izoleycin-o9357832.html> 21 - [https://prom.ua/ua/p539775876-  
lejtsin.html?utm\\_source=google\\_pla&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=UA\\_cpa\\_15\\_30\\_sport\\_i\\_otdykh&gclid=EAIaIQobChMI9v\\_quLzg8AIVgwZ7Ch18bQIXEAQYASABEGsPfd\\_BwE](https://prom.ua/ua/p539775876-lejtsin.html?utm_source=google_pla&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=UA_cpa_15_30_sport_i_otdykh&gclid=EAIaIQobChMI9v_quLzg8AIVgwZ7Ch18bQIXEAQYASABEGsPfd_BwE) 22 - <https://www.systopt.com.ua/item-1-lizyn-gidrohlorid> 23 - [https://zahid-  
agromiks.com.ua/p711828657-aminokislota-metionin-  
kormovij.html?source=merchant\\_center&gclid=EAIaIQobChMIwMySub3g8AIVi9OyCh3mxg9sEAQYASABEGsL5qPD\\_BwE](https://zahid-agromiks.com.ua/p711828657-aminokislota-metionin-kormovij.html?source=merchant_center&gclid=EAIaIQobChMIwMySub3g8AIVi9OyCh3mxg9sEAQYASABEGsL5qPD_BwE) 24 - <https://ternopol.flagma.ua/uk/fenilalanin-1-fasovka-1-kg-o11896798.html> 25 -  
<https://prom.ua/p617652512-serin-ser-100g.html?> 26 - [https://prom.ua/p400522834-  
tirozin.html?utm\\_source=google\\_pla&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=cpa\\_sport\\_i\\_otdykh&utm\\_term=%7Bkeyword%7D&gclid=EAIaIQobChMIxLaiipi67gIVBJeyCh1JHQkjEAQYASABEGsJgHfd\\_BwE](https://prom.ua/p400522834-tirozin.html?utm_source=google_pla&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=cpa_sport_i_otdykh&utm_term=%7Bkeyword%7D&gclid=EAIaIQobChMIxLaiipi67gIVBJeyCh1JHQkjEAQYASABEGsJgHfd_BwE) 27 - <https://prom.ua/p1245850685-valin-upakovka.html?> 28 - [https://lenreactiv-  
shop.ru/katalog-2/zhelezo-limonnokisloe-1-vodnoe-tsitrat-zheleza-iii-imp-0-1-kg/](https://lenreactiv-shop.ru/katalog-2/zhelezo-limonnokisloe-1-vodnoe-tsitrat-zheleza-iii-imp-0-1-kg/) 29 -  
<https://prom.ua/p384765154-hlorid-medi-med.html?> 30 - [https://prom.ua/p631688613-kobalt-  
hloristyj.html?](https://prom.ua/p631688613-kobalt-hloristyj.html?) 31 - <https://prom.ua/p27892230-tsink-hloristyj-kitaj.html?&primelead=MC41NQ> 32 -  
[https://www.helicon.ru/catalog/reagenty/obshchelaboratornye-reaktivy/bufery/bufer-mops-sukhoy-46-  
103-rm/?q=46-103-RM](https://www.helicon.ru/catalog/reagenty/obshchelaboratornye-reaktivy/bufery/bufer-mops-sukhoy-46-103-rm/?q=46-103-RM) 33 - <https://prom.ua/p883756923-natrij-uksusnokislyj-atsetat.html?> 34 -  
<https://ukrhim.com.ua/p415265819->

[vitamin.html?source=merchant\\_center&gclid=EAIaIQobChMIpv2gvtXk8AIVFamyCh21ew-0EAYYYBCABEgIr9vD\\_BwE](vitamin.html?source=merchant_center&gclid=EAIaIQobChMIpv2gvtXk8AIVFamyCh21ew-0EAYYYBCABEgIr9vD_BwE) 35 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-vitamin-n-biotyn> 36 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-vitamin-v2-ryboflavin> 37 - <https://ukrhim.com.ua/p671010310-vitamin-pantotenat-kaltsiya.html> 38 - <https://prom.ua/p65345524-natrij-tiosulfat-giposulfit.html>

Дані, наведені в табл. 2.2., свідчать, що найдешевшим поживним середовищем для культивування штаму *Bordetella pertussis* Tohama I є середовище MSS-CDM, а найдорожчим – середовище IMP2-CDM (з такою ж концентрацією амінокислот, як у середовищі MSS-CDM).

Аби остаточно обрати середовище для культивування, розрахуємо умовну вартість 1 г цільового продукту, синтезованого на кожному з чотирьох середовищ (табл. 2.3).

Таблиця 2.3.

**Умовна вартість 1 г кашлюкового токсину, синтезованого на різних поживних середовищах**

Назва поживного середовища	Концентрація КТ, г/л	Тривалість культивування, год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5
MSS-CDM	0,0225	39	126,92	5640,89
IMP-CDM	0,029	47	251,07	8657,57
IMP2-CDM	0,0367	41	251,07	6841,14
IMP2-CDM (з такою ж концентрацією амінокислот, як у середовищі MSS-CDM)	0,0323	43	251,72	7793,19

Умовна вартість кашлюкового токсину, синтезованого *Bordetella pertussis* Tohama I на середовищі MSS-CDM є найнижчою, а на середовищі IMP-CDM – найвищою.

Отже, проаналізувавши дані з усіх трьох таблиць, можна зробити висновок, що найоптимальнішим буде культивування штаму *Bordetella pertussis* Tohama I на

поживному середовищі MSS-CDM, зважаючи на найвищий вихід продукту з-поміж усіх інших штамів, найдешевше поживне середовище, найнижчу вартість 1 г кашлюкового токсину й порівняно невисоку тривалість культивування.

## 2.2. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Бактерії *Bordetella pertussis* (інша назва – палички Борде-Жангу) – це нерухливі палички з заокругленими кінцями (рис. 2.1., 2.2.), що забарвлюються за Грамом негативно в рожевий або червоний колір (рис. 2.3.). Діаметр їхніх клітин становить  $0,2-0,5 \times 0,5-1$  мкм [17]. У мазках розташовуються поодинокі, рідше – попарно [18].



Рис. 2.1. Електронна мікроскопія клітин *B. pertussis* [19]



Рис. 2.2. Електронна мікроскопія клітин *B. pertussis* [18]

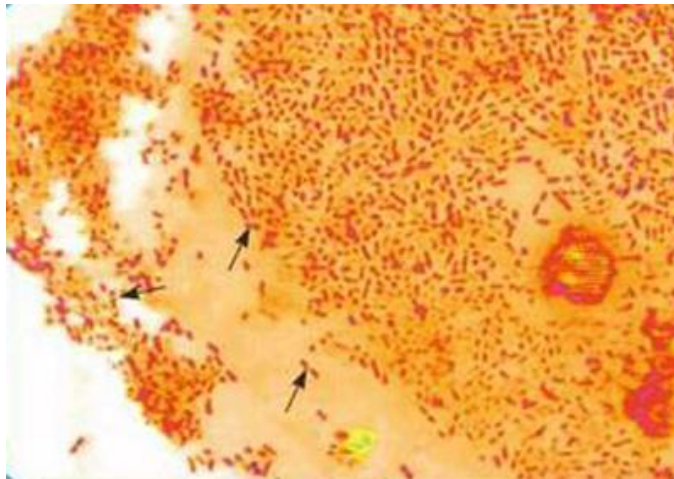


Рис. 2.3. Клітини *B. pertussis*, забарвлені негативно за Грамом [18]

Ці бактерії не утворюють спор, не мають джгутиків, але утворюють капсулу (рис. 2.4.) [20].

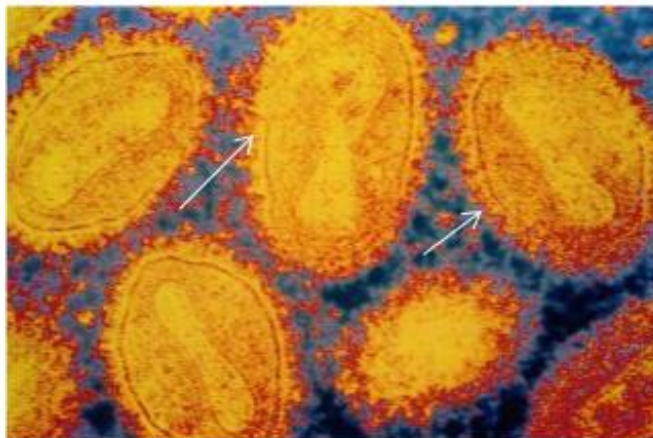


Рис. 2.4. Капсули *B. pertussis* [21]

Палички Борде-Жангу ростуть повільно за температури 37 °С на селективних середовищах, які містять вітаміни та кров. Найбільш придатними для культивування є середовище Борде-Жангу (картопляно-гліцеринно-кров'яний агар) і казеїново-вугільний агар (КВА). На середовищі Борде-Жангу за 2-5 діб вирощування з'являються колонії *B. pertussis*: гладкі, опуклі, вологі, сірі з перламутровим блиском, зі слабкою зоною гемолізу. Вони нагадують дрібні краплинки ртуті чи перлинки (рис. 2.5.) [17, 20].



Рис. 2.5. Колонії *B. pertussis* на середовищі Борде-Жангу [22]

На КВА колонії дрібні, мають округлу куполоподібну форму, сметаноподібну консистенцію та сірувато-кремовий колір. (рис. 2.6.). Розмір колоній – 0,5-1,0 мкм [17, 20].



Рис. 2.6. Колонії *B. pertussis* на КВА [21]

*B. pertussis* – дуже вибагливі мікроорганізми, що не ростуть на простих поживних середовищах (МПА та МПБ) [17, 20]. У рідкому поживному середовищі бактерії утворюють рівномірну муть і придонний осад [23].

Ці бактерії є гемоглобінофільними: вони добре ростуть на середовищах, збагачених кров'ю. Стороння мікрофлора пригнічує ріст *B. pertussis*, тому до поживного середовища додають антибіотик (пеніцилін або певний цефалоспорин) [18].

*B. pertussis* є облігатними аеробами [18]. За типом живлення – хемоорганотрофи [24]. Ці бактерії не розщеплюють вуглеводи та спирти, не утворюють індол, не відновлюють нітрати до нітритів, не продукують уреазу та нітразу, не використовують цитрат як єдине джерело вуглецю [38]. Не ферментують білки [23]. Володіють низькою ферментативною активністю, оксидазопозитивні [25]. Дають негативні результати у тесті на каталазну активність та MRVP-тесті (тест з метиленовим червоним і реакція Фогес-Проскауера) [22].

*B. pertussis* стійкі до тетрацикліну (2-5 мкг/мл), стрептоміцину (2-5 мкг/мл), малочутливі до пеніциліну. Проте вони чутливі до таких антибіотиків: еритроміцин, ампіцилін, гентаміцин, азитроміцин, кларитроміцин, спіраміцин, канаміцин, хлорамфенікол [26].

Крім антибіотиків, життєдіяльність *B. pertussis* пригнічують також фізичні чинники та дезінфектанти: під впливом розсіяного сонячного світла бактерія гине за 2 год, під впливом прямого сонячного світла – за 1 год; ультрафіолетове опромінювання спричиняє загибель цих бактерій за декілька хвилин. За температури 56 °С *B. pertussis* гине за 10-15 хвилин, під дією дезінфікувальних розчинів у звичайних концентраціях – за декілька хвилин. У сухому харкотинні паличка Борде-Жангу існує декілька годин; у крапельному аерозолі – 20-23 год [27].

Оптимальна температура росту становить 35-36 °С, а значення рН – 6,8-7,4 [23]. Отже, за відношенням до температури *B. pertussis* є мезофільним мікроорганізмом, а за відношенням до рН – нейтрофільним.

Поживне середовище для культивування цих бактерій обов'язково повинно містити пролін, цистеїн і глутамінову кислоту. У процесі вирощування бактерій ці амінокислоти накопичують метаболіти, такі як ненасичені жирні кислоти, сульфіді, перекисні сполуки, що може пригнічувати ріст *B. pertussis*. Щоб уникнути цього, до

складу поживних середовищ додають сполуки з адсорбуючою здатністю, наприклад, кров, активоване вугілля, альбумін – ці речовини містяться в типових поживних середовищах для культивування *B. pertussis* [28].

### **2.3. Таксономічний статус біологічного агента**

Філогенетичну класифікацію для *B. pertussis* наведено відповідно до другого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій [24].

Домен – *Bacteria*

Тип – *Proteobacteria*

Клас –  $\beta$ - *Proteobacteria*

Порядок – *Burkholderiales*

Родина – *Alcaligenaceae*

Рід – *Bordetella*

Вид – *pertussis*

## РОЗДІЛ 3

### ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

#### 3.1. Потреба у цільовому продукті

Кашлюк – це бактеріальне захворювання дихальних шляхів, спричинене *Bordetella pertussis*. Ця хвороба швидко передається від людини до людини повітряно-крапельним шляхом при кашлі або чханні. Діти, хворі на кашлюк, страждають від нападів кашлю протягом 4-8 тижнів. Найбільш вразливими перед цим захворюванням є немовлята.

Першими симптомами кашлюку є жар, нежить і кашель, який зазвичай переходить у судомний. У немовлят хвороба може супроводжуватися періодами тимчасового припинення дихальних рухів (апноє). Пневмонія є доволі поширеним ускладненням кашлюку, рідше виникають конвульсії й енцефалопатія. Ознаки захворювання зазвичай з'являються за 7-10 днів після інфікування.

Попередити хворобу можна завдяки вакцинації. Відповідно до національного календаря щеплень, вакцинувати дітей для профілактики кашлюку необхідно у віці 2, 4, 6 і 18 місяців (чотири щеплення) [29].

Для вакцинації можуть використовуватися вакцини як з ацелюлярним (АаКДП), так і з цільноклітинним (АКДП) кашлюковим компонентом. АКДП містить цілі інактивовані клітини збудника, а АаКДП містить безклітинний, тобто ацелюлярний кашлюковий компонент. Обидва типи вакцин формують у щеплених дітей стійкий імунітет до кашлюку, дифтерії та правця.

Одна доза вакцини (0,5 мл) містить 25 мкг кашлюкового анатоксину [30].

В Україні виявлено приблизно 2471 випадок захворюваності на кашлюк, з них 2415 – у дітей [31].

Народжуваність в Україні становить близько 306,4 тис [32]. Одна дитина потребує 0,5 мл (25 мкг кашлюкового анатоксину).

					<i>НУХТ БТЕК 04.01.34 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркциів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Салімова Е.Г.</i>						<i>31</i>	<i>89</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Скороцька О.І.</i>							
<i>Консультант</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							
						<b>Кафедра БТМ</b> 31		

Курс вакцинації [33]:

Перша доза – у віці 2 місяців, друга доза – у віці 4 місяців, третя доза – у віці 6 місяців, четверта доза – у віці 18 місяців. Всього: 0,5 мл (25 мкг кашлюкового анатоксину) · 4 = 2 мл (100 мкг кашлюкового анатоксину).

Визначимо потребу в анатоксині для дитячого населення:

$$100 \text{ мкг анатоксину} \cdot 306\,400 \text{ дітей} = 30\,640\,000 \text{ мкг} = 30,64 \text{ г}$$

Оскільки проти кашлюку вакцинують лише дітей, то це і є вся потреба.

Узагальнені дані про потребу населення України в кашлюковому анатоксині – компоненті вакцини АКДП наведено в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

**Річна потреба населення України в кашлюковому анатоксині –  
компоненті вакцини АКДП**

Категорії хворих	Доза анатоксину, мкг	Курс вакцинації, кількість доз	Кількість хворих, чол.	Кількість препарату для річного курсу вакцинації, г
Діти (до 17 років включно)	25	4	2415	30,6

Україна закуповує вакцини АКДП в Індії [34].

**3.2. Розрахунок потужності виробництва**

Визначимо потребу у кашлюковому анатоксині при реалізації даного проекту не більше 10 %.

Отже, потужність виробництва складе:

$G_{\text{гп}} = 30,6 \times 0,1 = 3,06 \text{ г}$ . Приймаємо  $G_{\text{гп}} = 3 \text{ г}$  субстанції для виробництва даного ЛЗ.

Потужність виробництва кашлюкового анатоксину становить  $G_{\text{гп}} = 3$  г/рік.

Продуцент кашлюкового токсину – *Bordetella pertussis* Tohama I синтезує 22,5 мг токсину на 1 літр культуральної рідини [35].

Кількість культуральної рідини, необхідної для отримання 3000 мг КТ (3 г) становить: 22,5 мг – 1 л; 3000 мг – X;  $X = 133,33$  л культуральної рідини. Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (40 %), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:  $V_{\text{кр}} = 133,33 / (1 - (0,3 + 0,1)) = 222,22$  л.

### 3.3. Розрахунок об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Розрахуємо, який об'єм культуральної рідини треба отримати за цикл ферментації, щоб визначити кількість стадій приготування посівного матеріалу. Приймаємо кількість робочих трудоднів (Трд) 100, тоді кількість продукту на добу ( $V_{\text{д}}$ ) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{гп}} / \text{Трд} = 222,22 / 100 = 2,22 \text{ л.}$$

Кількість продукту за цикл ( $V_{\text{кр}}$ ) буде становити:

$V_{\text{кр}} = (K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 \cdot 2,22 \cdot 49) / 24 = 5$  л/цикл, де  $T_{\text{цф}}$  – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (39 год) та час підготовки ферментера до роботи (10 год).  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ( $K_1 = 1,1 - 1,5$ ). Підготовка ферментатора включає: миття та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год). 5 л культуральної рідини ( $V_{\text{цк}}$ ) можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$V_{\text{г}} = V_{\text{цк}} / K_{\text{зап}} = 5 / 0,6 = 8,3$  л, де  $K_{\text{зап}} = 0,6$  – коефіцієнт заповнення ферментера. У додатку 4 знаходимо найближчий за геометричним об'ємом ферментер  $V_{\text{ф}} = 10$  л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення  $K_{\text{зф}} = V_{\text{цк}} / V_{\text{ф}} = 5 / 10 = 0,5$ , що не перевищує заданого значення.

### 3.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують  $V_{\text{кр}} = 5$  л культуральної рідини. При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті

краплиносу крізь колектор відпрацьованого повітря, які становлять від 10 до 15%. Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$V_{роб.1} = V_{кр}/(1-E_{ф}) = 5/(1-0,15) = 6$  л, де  $E_{ф}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом  $V_{роб.1} = 6$  л. При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{зап} = 0,5-0,6$  розраховують можливий геометричний об'єм ферментера ( $V_{ф}$ ), що становить

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

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} = 10$  л (див. додаток 4), та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

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

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже, геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1+X_{ф}) = 6 / (1+0,1) = 5,4$  л, де  $X_{ф} = 0,1$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 6 - 5,4 = 0,6 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту  $V_{пм1} = 0,6$  л можна одержати культивуванням бактерій у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом  $V_{колб} = 750$  мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,2$ . Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме  $N_{колб} = V_{пм1} / (V_{колб} \cdot K_{зк}) = 600 / (750 \cdot 0,2) = 4$ . Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідні 4 качалочні колби. Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу КТ у ферментері об'ємом 10 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити в один етап (рисунок).

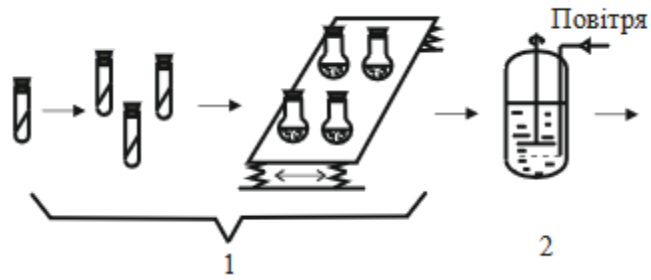


Рис. 3.1. Схема приготування посівного матеріалу *Bordetella pertussis* Tohama

I:

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

### ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

#### 4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

##### 4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

Вибір оптимальних умов та способу культивування залежить від фізіолого-біохімічних властивостей продуцента.

1. *Bordetella pertussis* Tohama I є мезофільною бактерією (оптимальна температура росту становить 35-36 °С), а за відношенням до рН – нейтрофільною (рН – 6,8-7,4) [23]. Крім того, це патогенний мікроорганізм, і щоб уникнути зараження персоналу застосовують глибинний спосіб культивування.

2. *Bordetella pertussis* Tohama I – облігатний аероб [18], тому наявність аераційного повітря та ввімкненого перемішувального пристрою для збільшення контакту фаз є обов'язковими умовами культивування. Аерацію культуральної рідини здійснюють за допомогою барботера всередині ферментера.

3. Для забезпечення асептичних умов необхідно простерилізувати поживне середовище, обладнання та комунікації, аераційне повітря. Щоб уникнути контамінації, створюють надлишковий тиск подачею стерильного аераційного повітря.

4. Культивування здійснюється періодичним способом, адже за таких умов мікроорганізми повніше споживають субстрат за рахунок того, що він вноситься одноразово і споживається бактеріями протягом усього вирощування. Крім цього, культивування патогенних мікроорганізмів здійснюють саме таким способом.

Таким чином, культивування *Bordetella pertussis* Tohama I – продуцента кашлюкового токсину – здійснюється за допомогою періодичного способу культивування за аеробних умов з дотриманням асептики проведення процесу.

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.34 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ доким.	Підпис	Дата	<b>РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми</b>	Літ.	Арк.	Архів
Розроб.	Салімова Е.Г.						36	89
Перевір.	Скороцька О.І.							
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.					<b>Кафедра БТМ</b>		36

Беручи до уваги умови культивування продуцента, будова й обладнання ферментера можуть бути різними. Спочатку потрібно обрати спосіб вирощування відповідно до фізіолого-біохімічних властивостей біологічного агента. Потім треба визначитися з оснащенням ферментера, що може забезпечити створення необхідних умов культивування. Головною умовою до ферментера в цьому випадку є можливість проведення процесу культивування в асептичних умовах за інтенсивної аерації.

1. З метою забезпечення аеробних умов ферментер має бути оснащений барботером, а також датчиком аерації середовища.

2. Оскільки культивування має проводитися в асептичних умовах, ферментер має бути герметичним, а лінії трубопроводів мають витримувати стерилізацію парою і працювати за надмірного тиску.

3. Для інтенсифікації масообмінних процесів і кращої гомогенізації культуральної рідини потрібно обрати лопатевий перемішувальний пристрій із частотою обертів 500 об/хв [36].

4. З метою забезпечення сталої температури культивування ферментер повинен мати сорочку й датчик температури.

5. Для контролю рівня рН у ферментері має бути датчик рН.

6. Для контролю температури середовища ферментер має бути оснащений відповідним датчиком.

7. Для запобігання надлишкового утворення піни можна використати механічний спосіб піногасіння, а саме лопатевий перемішувальний пристрій.

8. З метою підтримання оптимальної температури росту мікроорганізму застосовують охолодження ферментера оборотною водою (за аеробного культивування спостерігається значне виділення тепла).

9. Для підтримання оптимального значення рН середовища має бути передбачено приготування буферного розчину.

Беручи до уваги всі вищезазначені вимоги, доцільно буде обрати ферментер BIOSTAT® Cplus об'ємом 10 л (рис. 4.1). Даний ферментер застосовується у виробництві вакцин [37].



Рис. 4.1. Ферментер (біореактор) із неіржавіючої сталі BIOSTAT® Cplus [37]  
Основні характеристики й особливості ферментера BIOSTAT® Cplus:

- датчики температури, рН, розчиненого кисню, рівня піни й культуральної рідини, необслуговувемий привод мішалки, барботер, стерильні фільтри й охолоджувач відпрацьованого газу;
- управління й регулювання швидкості перемішування рН, концентрації розчиненого кисню, температури, подачі субстрату й піногасника, складу газової суміші;
- швидкість обертів мішалки – 20-1000 об/хв;
- температура – 0-150°C, рН – 2-12, рO<sub>2</sub> – 0-100%;
- швидкість обертання ротора – 5-50 об/хв;
- система управління температурою – закрыта термостатуюча система з рециркуляційним насосом, теплообмінником для охолодження / нагріву чи сухий нагрів.

#### 4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Одержання великої кількості стерильного повітря для аерації під час культивування аеробних мікроорганізмів є важливим завданням у галузі біотехнології. Найчастіше стерильне повітря використовують з метою аерації у ферментаційних процесах. В атмосферному повітрі, крім інертних газів, азоту, кисню й вуглекислого газу, містяться пари води та дрібнодисперсні частки. Більше ніж 30% часточок мають розмір 1–2 мкм і приблизно 50% – менше за 0,5 мкм. До дисперсних часток належать частки пилу, кіптяви, клітини та спори мікроорганізмів у вільному й сорбованому на пилових часточках стані.

Температура й вологість повітря, кількість у ньому часток і мікроорганізмів не є сталою і залежить від пори року (наприклад, улітку в повітрі міститься в 10 разів більше мікроорганізмів, ніж узимку); погодних умов (найбільша кількість пилу та мікроорганізмів є за сухої вітряної погоди); розташування підприємства; висоти забору повітря.

Найбільша кількість мікроорганізмів є над поверхнею землі, а при збільшенні висоти їхня концентрація зменшується і стає постійною на рівні 30 м над землею.

Найлегший метод стерилізації повітря - це фізичне видалення мікроорганізмів за допомогою фільтрації крізь волокнисті чи мембранні фільтри (набивні фільтри з надтонким волокном, скловолокном, тканиною Петрянова, фільтри з пористого фторопласту).

### **Очищення повітря**

Технологічно й економічно виправданим є спосіб очищення повітря, використовуючи волокнисті й пористі матеріали. Так вдається отримати повітря зі ступенем чистоти 99,9999%. Часточки, що зависли в повітрі, затримуються волокнистим матеріалом завдяки інерційному й дифузійному механізмам осадження. Механізм інерційного осадження заснований на тому, що коли повітряний потік починає обтікати нитку волокна на своєму шляху, завислі в цьому потоці частки рухаються за інерцією, відхиляючись від потоку повітря, й осаджуються на волокні. Застосування способу інерційного осадження є ефективним на порівняно грубих волокнах для відносно великих часток і за високої

швидкості повітря.

Метод дифузійного осадження ґрунтується на здатності маленьких часточок до броунівського руху. Частки, що рухаються поблизу волокна, дифундують у випадкових напрямках і можуть затримуватися на поверхні волокон. Ефект осадження збільшується зі зменшенням діаметра волокна фільтруючого матеріалу, діаметра частки та швидкості повітря.

У головних фільтрах для грубого очищення використовуються такі фільтруючі матеріали як грубе базальтове волокно та високооб'ємний нетканий фільтруючий матеріал, або тканина Камінської.

В індивідуальних фільтрах для тонкого очищення повітря застосовуються фільтри Петріянова з тканиною Петріянова, що складається з ультратонких полімерних волокон, сформованих у виді тканини на марлевій підкладці; також використовують базальтове надволокно, з якого виробляють базальтовий папір і картон.

Останнім часом з метою тонкої очистки повітря використовують тверді пористі перегородки з пластмас і металокераміки. Перевагою цих матеріалів порівняно з волокнистими є стабільна структура, стійкість до підвищених температур, просте конструктивне оформлення, легкість обслуговування фільтрів. Недоліком є високий перепад тиску. Найчастіше використовують фільтруючі матеріали з фторопласту й металокераміки у вигляді втулок ФЕП – фільтруючого елемента патронного типу. Для стерилізації повітря рекомендовано також мембрани з діаметром пор 0,45 мкм. Пористість мембран сягає 80%. Видалення мікроорганізмів за допомогою мембран базується на ефекті «сита».

**Перша підсистема.** Атмосферне повітря забирають турбокомпресором крізь забірну шахту висотою 20 – 30 м (там, де концентрація мікроорганізмів є стабільною). Спочатку повітря надходить у фільтри попереднього очищення, де звільняється від пилу. Фільтри попереднього очищення захищають компресори від забруднення та знижують кількість контамінантів, які могли б потрапити до другої підсистеми.

Потім повітря стискають у турбокомпресорі до 0,35–0,5 МПа. Тиск повітря у компресорі визначають з розрахунку тиску на подолання опору в системі повітропідготовки, тиску стовпа рідини у ферментері та створення в ньому тиску 0,13–0,14 МПа. Стиснення повітря в компресорі призводить до підвищення його температури до 120–250°C та збільшенню вологовмісту на одиницю об'єму.

**Друга підсистема.** За високого вмісту вологи у вихідному атмосферному повітрі конденсується ще більша кількість вологи при його охолодженні. Осідання вологи на фільтрах є неприпустимим, тому що це призводить до злипання волокон і утворення каналів, а це у свою чергу погіршує седиментацію часточок. Також, на зволжених волокнах фільтрів здатні розмножуватися осілі мікроорганізми, і це призводить до додаткового забруднення повітря. Аби забезпечити випадання вологи в каплевловлювачі, повітря «переохолоджують» до температури 25 – 40°C у теплообміннику. З метою забезпечення надійної роботи фільтрів 2-го і 3-го рівнів, повітря нагрівають до температури 70–90°C. За таких температур пара води не конденсуватиметься на волокнах фільтра. Для цього повітря після краплевловлювача нагрівають у теплообміннику, при цьому допускається часткове підмішування гарячого повітря після компресора. Кількість повітря, що підмішується, визначається умовами відносної вологості, що не повинна бути вищою за 40%.

**Третя підсистема** складається з двох фільтрів другого і третього рівнів очищення. Фільтр другого рівня, або головний, розташований на території заводу поряд із цехом. На ньому очищують повітря для ферментерів цеху. З головного фільтра повітря подається за допомогою колектора до індивідуальних фільтрів третьої рівня, встановлених на кожному ферментері, незалежно від його місткості. Конструкція індивідуального фільтра залежить від виду фільтруючого матеріалу. При використанні фільтрів їх потрібно стерилізувати. Найкращим способом є нагрівання вологою парою й витримка за температури 125–130°C. Застосування вищої температури викликає деструкцію герметизуючих прокладок у фільтрах. Після стерилізації фільтруючий матеріал висушують гарячим повітрям.

## Стадії підготовки повітря для аерації

Підготовка аераційного повітря складається з декількох стадій:

- забір атмосферного повітря (здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником у найвищій точці ( $H \sim 30$  м) будівлі, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря);
- очищення повітря від пилу ( $\delta > 50$  мкм) на плоских тканинних фільтрах грубого очищення;
- стиснення повітря в компресорах або турбоповітрядувках (повітря нагрівається до температури  $120 - 200$  °С);
- охолодження стисненого повітря до температури «точки роси», за якої волога повітря конденсується (використовують водяні теплообмінники різного типу: кожухотрубні, «труба в трубі»);
- видалення конденсованої вологи та парів мастила, що потрапили з компресора, у ресивері (ємність великого об'єму); крім того ресивер зменшує пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу подальших фільтрів очищення повітря;
- стабілізація показників (тиск, температура) підігріванням до температури  $45-50$  °С паром у відповідних теплообмінниках;
- очищення у головних ємнісних набивних фільтрах до ступеня очищення  $E = 95\%$ . Головні фільтри встановлюються біля ферментаційних відділень;
- очищення в індивідуальних фільтрах: повітря подається від головних фільтрів крізь трубопроводи (колектори) до індивідуальних фільтрів, встановлених на ферментері. Повітря очищують до ступеня очищення  $E = 99,99\%$ . [38]

### 4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Мийно-дезінфікуючі засоби мають задовольняти достатньо жорсткі вимоги. Ці засоби повинні:

- бути добре розчинними у воді;

- легко й повністю змиватися при споліскуванні;
- бути безбарвними;
- не мати стійкого запаху;
- не чинити агресивну дію щодо матеріалів, з яких виготовлене обладнання;

- володіти слабкою корозійною активністю;
- бути стійкими при зберіганні, використанні, транспортуванні;
- не знижувати активності протягом тривалого часу;
- бути пожежо- й вибухобезпечними;
- бути безпечними для навколишнього середовища й повністю розкладатися на нешкідливі сполуки;

- бути безпечними для людей і тварин;
- мати широкий спектр антимікробної дії;
- виявляти бактерицидну дію щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів за присутності органічних речовин, солей твердості і мікроорганізмів у біоплівках;

- не володіти подразнюючою дією на шкіру рук;
- бути нетоксичними або малотоксичними;
- бути відносно дешевими й виготовлятися з місцевої сировини;
- не фарбувати й не забруднювати об'єкт дезінфекції [39].

Миючі та дезінфікуючі засоби повинні задовольняти такі вимоги:

- виражені миючі властивості (миюча здатність не менше 90,0%);
- виражена дезінфікуюча здатність (не менше 90,0%);
- повне змочування поверхонь із різних конструктивних матеріалів;
- низька агресивність по відношенню до конструктивних матеріалів, призначених для виготовлення технологічного обладнання, комунікацій, інвентаря;

- повне змивання з робочих поверхонь об'єктів підприємства при мінімальних втратах води вироблюваної продукції.

Оброблюваними об'єктами є підлога, стіни, ферментер та інше технологічне обладнання. Їхнє миття здійснюють 1 раз на тиждень. Використовують такі засоби: «Біонол», «Біомой», «Гембар», «Дезактин», «Хлорантоїн», «Дезосепт Форте» тощо.

Для миття й дезінфекції технологічного обладнання доцільно буде використати мийно-дезінфікувальний засіб Біомой (вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %: алкілбензолсульфонат натрію (сульфонол) 5,0-8,0; лужна протеаза 1,0-1,1 (діючі речовини); натрію карбонат; диспергатор; наповнювач).

**Форма випуску і фізико-хімічні властивості засобу:** сипкий порошок від білого до світло жовтого кольору. Допускається наявність грудочок, які подрібнюються при натисканні, та забарвлених включень ензимів. Має характерний запах використаної сировини. Концентрація водневих іонів (рН) розчину з масовою часткою 1 % 9,0-11,5 од. рН. Добре розчиняється у воді. Водні розчини Біомою прозорі, безбарвні, не кородують вироби медичного призначення із металу, скла, полімерних матеріалів, гуми та комбінованих матеріалів. Засіб не сумісний з катіонними поверхнево-активними речовинами. **Призначення засобу:** достерилізаційне очищення виробів медичного призначення із металу, скла, гуми та полімерних матеріалів (включаючи жорсткі та гнучкі ендоскопи, медичні інструменти до гнучких ендоскопів, стоматологічні та хірургічні інструменти). Миття поверхонь приміщень, підлоги, предметів догляду за хворими, предметів інтер'єру тощо. Миття об'єктів навчально-виховних закладів, об'єктів комунально-побутового призначення, підприємств парфумерно-косметичної, мікробіологічної, харчової, переробної і фармацевтичної промисловості, закладів ресторанного господарства і торгівлі, перукарень, косметологічних салонів, аптек, місць тимчасового проживання, на транспорті. **Специфічні властивості засобу:** Біомой виявляє змочувальні, мийні, емульгуючі властивості, видаляє білкові, жирові забруднення, залишки крові, лікарських та дезінфекційних засобів із зовнішніх

поверхонь і поверхонь внутрішніх каналів виробів медичного призначення, легко змивається з оброблених виробів, не залишає нальоту.

**Токсичність та безпечність засобу:** Біомой належить до помірно небезпечних речовин при введенні у шлунок (3 клас безпеки згідно з ГОСТ 12.1.007) та до мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру (4 клас безпеки згідно з ГОСТ 12.1.007). Не виявляє шкірно-резорбтивних, шкірно-подразнювальних та сенсibiliзуючих властивостей. У нативній формі (порошок) спричиняє подразнення слизової оболонки очей та верхніх дихальних шляхів. У рекомендованих до застосування концентраціях не подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів. Не виявляє мутагенних, канцерогенних та ембріотоксичних властивостей (за діючою речовиною). Використання робочих розчинів Біомою для ручного та механізованого достерилізаційного очищення виробів медичного призначення, враховуючи відсутність у його складі летких компонентів, не становить загрози надходження компонентів засобу у повітря робочої зони [40].

Для миття й дезінфекції стін і підлоги варто застосовувати такі засоби як «Дезактин» і «Хлорантоїн» з інтервалом у 3 місяці з метою запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів.

#### **Інструкція щодо застосування засобу «Дезактин»**

**Склад засобу, %:** дихлорантин - 21,0-23,0; 5,5-диметилгідантоїн - 12,4-16,4; диспергатор - 9,0-12,0; аніонні поверхнево-активні речовини - 3,2-5,0; інгібітор корозії до 10,0; наповнювач до 100,0. Вміст активного хлору становить не менше 14,0%.

**Властивості:** Дезактин має широкий спектр антимікробної активності: бактерицидні (в т.ч. туберкулоцидні), віруліцидні (включаючи парентеріальні вірусні гепатити, ВІЛ-інфекцію, рота-, паповавіруси), фунгіцидні (в т.ч. гриби роду *Candida*) властивості.

Препарат призначений для дезінфекції та очищення поверхонь всіх видів (приміщення, меблі, прилади, інвентар, посуд, санітарно-технічне обладнання тощо)

для дезінфекції, передстерилізаційного очищення, а також суміщених процесів дезінфекції та передстерилізаційного очищення медичних інструментів (в тому числі хірургічних, стоматологічних та ін.) з корозійностійких металів. Має миючі якості. Зручний для персоналу при приготуванні і використанні.

**Дезактин може використовуватися:**

- в лікувально-профілактичних установах, лабораторіях, аптеках;
- в спортивних, оздоровчих, дитячих, навчальних закладах; на комунальних об'єктах;
- на підприємствах харчової, косметичної, фармацевтичної, мікробіологічної промисловості;
- в закладах громадського харчування; на всіх видах транспорту і ін. установах.

**Спосіб застосування.** Дезінфекцію можна проводити методами зрошення або протирання. Норма витрати 100 мл робочого розчину на 1 кв.м оброблюваної площі. Використовується для дезінфекції та одночасного очищення і миття при бактеріальних і вірусних інфекціях в 0,1-0,2% концентраціях при експозиції 60 хвилин, грибкових інфекціях і туберкульозі в 1% концентрації при експозиції 60-90 хвилин.

Дезактин відноситься до групи малонебезпечних речовин.

Термін придатності 3 роки. Термін зберігання робочих розчинів - до 24 годин [41].

**Інструкція щодо застосування засобу «Хлорантоїн»**

**Склад засобу, вміст діючих та допоміжних речовин, мас. %:** 1,3-дихлор-5,5-диметилгідантоїн (дихлорантин) – 21,5-23,5 (діюча речовина); 5,5-диметилгідантоїн – 12,5-16,5; диспергатор - 9,0-12,5; аніонні поверхнево-активні речовини – 3,2-5,0; інгібітор корозії до 10,0; наповнювач до 100,0. Масова частка активного хлору становить не менше, ніж 14,1 %.

**Властивості.** Хлорантоїн має бактерицидні, туберкулоцидні, віруліцидні (включаючи збудника поліомієліту, всіх типів грипу, парагрипу, коронарної

респіраторно-синцитіальної, ротавірусної, аденовірусної інфекцій, SARS, гепатитів, ВІЛ, вірусних гастроентеритів і інших), спороцидні і фунгіцидні (включаючи збудників кандидозів, дерматомікозів, цвілевих грибів) властивості.

Крім того, Хлорантоїн застосовується в осередках особливо небезпечних і зооносних інфекцій (чума, холера, сибірська виразка тощо).

Хлорантоїн видаляє механічні білкові, жирові забруднення, залишки крові, залишки лікарських засобів із зовнішніх поверхонь, внутрішніх каналів та порожнин виробів медичного призначення.

За дезінфекційною активністю Хлорантоїн перевершує в 5-10 разів звичайні дезінфікуючі засоби і виключає застосування лужних миючих засобів. Використання Хлорантоїну дозволяє поєднати в одній операції стадії миття, дезінфекції та предстерилізації, скоротити тривалість санітарної обробки.

#### **Рекомендації щодо застосування**

- Для поточної та заключної дезінфекції в закладах охорони здоров'я, у вогнищах кишкових і крапельних інфекцій бактеріальної та вірусної етіології, туберкульозу, дерматомікозів, кандидозів;
- для передстерилізаційного очищення і об'єднання процесів дезінфекції та передстерилізаційного очищення виробів медичного призначення з корозієстійкого металу, скла, гуми і полімерних матеріалів;
- для профілактичної дезінфекції в закладах охорони здоров'я, на підприємствах фармацевтичної, мікробіологічної, парфюмерно-косметичної, харчової промисловості, аптечних закладах (аптечні склади, аптеки, аптечні пункти, аптечні кіоски), в дитячих дошкільних закладах, у навчально-виховних закладах різного рівня акредитації, в оздоровчих закладах (будинки відпочинку, санаторії, профілакторії тощо), в закладах сфери відпочинку та розваг, на комунальних об'єктах (готелі, кемпінги, гуртожитки, басейни, сауни, лазні, туалети загального користування), на об'єктах комунально-побутового призначення (перукарні, салони краси, манікюрні, педикюрні, косметичні кабінети, пральні, хімчистки тощо), на підприємствах

громадського харчування і торгівлі, на рухомих складах і об'єктах забезпечення залізничного, автомобільного, водного, повітряного транспорту і в установах зв'язку, в банківських установах та інших об'єктах;

- для санітарної обробки технологічного обладнання на підприємствах, що виготовляють кондитерські вироби з кремом, підприємствах косметичної промисловості, підприємствах пивобезалкогольної промисловості;

- для санітарної обробки ветеринарних об'єктів, приміщень та обладнання на підприємствах м'ясної, молочної та птахоперероблювальної промисловості;

- для санітарної обробки (миття та дезінфекції) доїльного обладнання, посуду, автоцистерн на молочних фермах;

- для одночасного прання та дезінфекції спецодягу працівників тваринництва і підприємств переробної промисловості.

### **Особливості застосування**

Робочий розчин готують у тарі будь-якого матеріалу, за винятком оцинкованого заліза, шляхом розчинення у воді при перемішуванні протягом 1-2 хвилин.

Для приготування робочих розчинів засобу використовують воду питну. При виготовленні робочих розчинів 0,5-2,5% концентрації доцільно спочатку приготувати суспензію засобу в невеликій кількості води, а потім довести водою до розрахованого об'єму. Допускається використовувати гарячу воду при температурі  $(60 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$  для приготування 0,5-2,5% розчинів засобу для прискорення його розчинення у воді.

**Термін придатності.** Робочі розчини Хлорантоїну готують безпосередньо перед використанням. Допускається зберігати невикористаний робочий розчин протягом 3 діб після виготовлення у тарі зі щільно закритою кришкою. Допускається застосовувати невикористаний робочий розчин з метою достерилізаційного очищення виробів медичного призначення та проведення

поточних і генеральних прибирань протягом 14 днів з моменту виготовлення. Робочі розчини Хлорантоїну використовують з метою дезінфекції одноразово. [42]

#### 4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Максимальний синтез кашлюкового токсину (22,5 мг за 39 год) досягається за умов росту штаму *Bordetella pertussis* Tohama I на середовищі такого складу (г/л): пролін – 1,04; глутамат натрію – 20; гідрохлорид цистеїну – 0,04; NaCl – 2,5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,5; KCl – 0,2;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,02;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,01; аскорбінова кислота – 0,4; глутатіон – 0,15; ніацин – 0,004; диметил –  $\beta$  – циклодекстрин – 1; аланін – 0,312; аспарагінова кислота – 0,436; глутамінова кислота – 1,6; гістидин – 0,188; гліцин – 0,163; ізолейцин – 0,288; лейцин – 0,484; гідрохлорид лізину – 0,6; метіонін – 0,156; фенілаланін – 0,25; серин – 0,23; тирозин – 0,067; валін – 0,456.

Відповідно до розрахунків, виробничий біосинтез кашлюкового токсину здійснюється у ферментері об'ємом 10 л, що містить 6 л середовища. Одержання інокуляту відбувається в один етап (у колбах на качалці). Об'єм поживного середовища не є великим, тому його стерилізують за допомогою автоклавування.

Для того, щоб визначити спосіб приготування деяких компонентів середовища (вітаміни, амінокислоти, мікроелементи), а також визначитися з необхідними для цього колбами, розрахуємо кількість таких компонентів, необхідну для приготування середовища на кожному з двох стадій виробництва (табл. 4.1 і 4.2). У табл. 4.1, 4.2 зазначено, що для обох стадій культивування (вирощування інокуляту в колбах на качалці та ферментері об'ємом 10 л) необхідно готувати запасні розчини мікроелементів і термолабільних сполук.

Нижче наведено особливості приготування і стерилізації середовища для вирощування інокуляту (1 стадія) і виробничого біосинтезу.

**Розрахунок вмісту мікроелементів для приготування 100 мл запасного розчину**

Об'єм середовища, л	Об'єм запасного розчину, мл	Вага мікроелементів для приготування 100 мл запасного розчину, г	
		CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
0,6	600 мкл	2	1
6	6		

**Розрахунок вмісту деяких термолабільних сполук для приготування 250 мл запасного розчину**

Об'єм середовища, л	Об'єм запасного розчину, мл	Вага термолабільних сполук для приготування 250 мл запасного розчину, г		
		Гідрохлорид цистеїну	Ніацин	Тирозин
0,6	600 мкл	10	1	17
6	6			

**Приготування та стерилізація компонентів поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці**

Для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці необхідно підготувати 0,6 л поживного середовища. Його об'єм не є великим, тому середовище можна стерилізувати за допомогою автоклавування.

Дане поживне середовище необхідно поділити на декілька композицій, адже воно містить термостабільні й термолабільні складові, що не можна стерилізувати разом.

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *Bordetella pertussis* Tohama I, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

**Композиція А:** пролін, аскорбінова кислота, глутатіон, аланін, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, гістидин, гліцин, ізолейцин, лейцин, метіонін, фенілаланін, серин, валін (режим стерилізації: 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв).

**Композиція Б:**  $\text{KН}_2\text{PО}_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 0,15 МПа, 40 хв).

**Композиція В:** гідрохлорид лізину, глутамат натрію,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , диметил –  $\beta$  – циклодекстрин, трис(гідроксиметил)амінометан (режим стерилізації: 131 °С, 0,15 МПа, 40 хв).

Складові композиції А є термолабільними речовинами і потребують м'якого режиму стерилізації. Фосфат композиції Б стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію. Компоненти композиції В стерилізують за стандартної для термостабільних сполук температури. Стерилізацію всіх трьох композицій здійснюють в автоклаві.

Окремо готують запасні розчини мікроелементів (100 мл) і деяких термолабільних сполук (250 мл) з розрахунку на використання у двох стадіях підготовки посівного матеріалу. Розчини мікроелементів стерилізують окремо в автоклаві за температури 131°С при значенні тиску 0,15 МПа упродовж 40 хв, а розчин термолабільних речовин – в автоклаві за температури 112°С при значенні тиску 0,05 МПа протягом 30 хв. При вирощуванні інокуляту в колбах на качалках за допомогою піпетки вносять по 600 мкл обох запасних розчинів.

### **Приготування та стерилізація компонентів поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері**

Середовище поділяють на три композиції:

**Композиція А:** пролін, аскорбінова кислота, глутатіон, аланін, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, гістидин, гліцин, ізолейцин, лейцин, метіонін, фенілаланін, серин, валін (режим стерилізації: 112 °С, 0,05 МПа, 30 хв).

**Композиція Б:**  $\text{KН}_2\text{PО}_4$  (режим стерилізації: 131 °С, 0,15 МПа, 40 хв).

**Композиція В:** гідрохлорид лізину, глутамат натрію,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , диметил –  $\beta$  – циклодекстрин, трис(гідроксиметил)амінометан (режим стерилізації: 131 °С, 0,15 МПа, 40 хв).

Складові композиції А є термолабільними речовинами і потребують м'якого режиму стерилізації. Фосфат композиції Б стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію. Компоненти композиції В стерилізують за стандартної для термостабільних речовин температури. Стерилізацію всіх трьох композицій здійснюють в автоклаві.

При вирощуванні посівного матеріалу в ферментері вносять по 6 мл обох запасних розчинів.

#### **4.2. Обґрунтування вибору розчинів для стабілізації рН**

Для стабілізації рН, яке повинно дорівнювати 7,2, у середовище за допомогою піпетки вносять 6 мл 50% розчину фосфорної кислоти від 200 мл розчину, який готують у колбі об'ємом 250 мл і стерилізують в автоклаві. За її використання відзначаються вищі показники синтезу цільового продукту.

**РОЗДІЛ 5**  
**СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ**

**Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу кашлюкового токсину**

Таблиця 5.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика	Примітка
1	2	3	4	5
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Оснащений металевією сіткою для видалення механічних забруднень	1
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр Viledon Фільтруючий матеріал – поліолефінові волокна; швидкість фільтрування – 2 м/с; Е = 90% Виробник: «Freudenberg Filtration Technologies» (Німеччина)	2
К-3	Компресор	1	Компресор Atlas Copco GX 3EP RACK Робочий тиск – 10 бар, продуктивність – 5,3 л/с; Виробник: «Atlas Copco» (Швеція)	3
Т-4 Т-6	Теплообмінник охолоджувач (нагрівач)	2	Теплообмінник Vader BL3-020-16, 3/4" Максимальний тиск – 1,6 МПа Максимальна робоча температура - 130°C Поверхня теплообміну – 0,37 м <sup>2</sup> Матеріал: неіржавіюча сталь Виробник: «Vader» (Австрія)	4

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.34 КР ПЗ</b>		
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ док.м.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>		<i>Салімова Е.Г.</i>			<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркцшів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Скороцька О.І.</i>				<b>53</b>	<b>89</b>
<i>Консультант</i>					<b>Кафедра БТМ</b>		
<i>Н. Контр.</i>					<b>53</b>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>			<b>53</b>		

**РОЗДІЛ 5. Специфікація  
обладнання**

**Кафедра БТМ 53**

Продовження табл. 5.1

P-5	Ресивер	1	Ресивер PB495.600.01 Робочий тиск – до 20 бар Об'єм – 10 л Матеріал – сталь Виробник: «ЛД Інвест» (Україна)	5
Ф-7	Головний фільтр	1	Фільтр тонкої очистки повітря Фільтруючий матеріал – скловолокно Пропускна здатність – 1200 м <sup>3</sup> Е = 95% Виробник: «New Filter» (Україна)	6
Ф-25	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр тонкої очистки повітря Фільтруючий матеріал – скловолокно Продуктивність – 1620 м <sup>3</sup> /год Максимальний тиск – 600 Па Е = 99,999% Виробник: «Фолтер-Україна» (Україна)	7
Кб-8, Кб-9, Кб-10, Кб-12, Кб-13, Кб-14, Кб-16, Кб-17, Кб-18, Кб-20, Кб-21, Кб-22, Кб-23	Колби	13	Колба конічна з градуванням Об'єм – 100, 250, 500, 750 мл; 1 л, 2 л, 5 л Матеріал – термостійке скло Виробник: «Cordial» (Китай), Виробник: «Стеклоприбор» (Україна)	8-14
Кч-34	Качалка для колб	1	Шейкер орбітальний SHLD0403DG Частота обертань – 100-1200 об/хв Виробник: Ohaus (США)	15

А-11, А-15, А-19	Автоклав для стерилізації компонентів поживних середовищ	3	Автоклав 2840ELV WR Об'єм - 31 л Виробник: «Tuttnauer» (США)	16
Н-26	Насос відцентровий	1	Відцентровий насос Salvatore Robuschi TS Матеріал – неіржавіюча сталь Продуктивність - 36 м <sup>3</sup> /год Виробник – «Salvatore Robuschi» (Італія)	17
Фр-27	Ферментер	1	Ферментер BIOSTAT Cplus, Робочий об'єм – 10 л Швидкість перемішування 20-1500 об/хв Габарити - 1900 x 1020 x 750 мм Матеріал корпусу – неіржавіюча сталь Виробник: Sartorius (Німеччина)	18

**Примітка.\*** - Джерела, згідно з якими наведено інформацію:

2. <http://www.meridian-filter.ru/filtratsiya-vozdukha/filtrovalnoe-polotno/filtrovalnoe-polotno-modelnyy-ryad-psb2/>
3. [http://компрессоры.рф/catalog/vintovye\\_kompressory/atlas\\_corco/atlascorco-gx/g\\_3ep.html](http://компрессоры.рф/catalog/vintovye_kompressory/atlas_corco/atlascorco-gx/g_3ep.html)
4. <https://hot-land.com.ua/p14803662-teploobmennik-bader-bl3.html>
5. [https://ldinvest.com.ua/resiver-vozdushnyj-10-bar-495-1-rv49560001-1-dlya-kompressora\\_19592.html](https://ldinvest.com.ua/resiver-vozdushnyj-10-bar-495-1-rv49560001-1-dlya-kompressora_19592.html)
6. <https://ventfilter.kiev.ua/p/249768537-filtr-tonkoy-ochistki-vozduha-ftov-hepa-hepa/>
7. <https://folter.com.ua/catalog/fyasu15u16>
8. <https://shop.hlr.ua/kolba-konicheskaya-labexpert-kn-2-250-34-ts-c-graduirovkoy-62557.html>
9. <https://shop.hlr.ua/kolba-konicheskaya-labexpert-kn-2-500-50-ts-gost-25336-82-57606.html>

10. <https://shop.hlr.ua/kolba-konicheskaya-s-graduirovkoy-1000-ml-cordial-89078.html>
11. <https://shop.hlr.ua/kolba-konicheskaya-d34-mm-100-ml-cordial-57604.html>
12. <https://thermolab.net.ua/p991635382-kolba-mernaya-konicheskaya.html>
13. <https://shop.hlr.ua/kolba-konicheskaya-s-graduirovkoy-4540-2000-ml-cordial-77099.html>
14. <https://evrobiznes.com.ua/kolba-konicheskaya-s-5000ml.html>
15. <https://www.dia-m.ru/catalog/lab/sheykery-main/shejkery-vysokoj-emkosti/sheyker-orbitalnyy-amplituda-3-mm-do-1200-ob-min-shld0403dg/>
16. <https://www.laboratorii.com/oborudovanie-dlja-laboratorij/avtoklavy/avtoklav-2840ELV-WR/>
17. <https://mir-nasosov.com.ua/production/mnogostupenchatye-nasosy>
18. <http://sartorius-sd.com.ua/index.php/%D1%81%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D1%83%D0%B5%D0%BC%D1%8B%D0%B5-%D0%BD%D0%B0-%D0%BC%D0%B5%D1%81%D1%82%D0%B5-%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80%D1%8B/biostat%C2%AE-cplus.html>

## РОЗДІЛ 6

### ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

У технологічній схемі наведено допоміжні роботи, такі як підготовка аераційного повітря, приготування розчину для підтримання рН середовища, запасних розчинів і поживного середовища, а також технологічний процес: підготовка посівного матеріалу та біосинтез цільового продукту. Цю схему представлено у графічній частині проекту.

#### *ДР 1. Підготовка аераційного повітря*

##### *ДР 1.1. Забір атмосферного повітря*

Атмосферне повітря забирають за допомогою вертикальної труби з повітрозабірником (ПЗ-1) у найвищій точці (Н ~ 3 м) будівлі, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря. Повітрозабірник оснащений металевою сіткою для видалення забруднень.

##### *ДР 1.2. Грубе очищення повітря*

Повітря пропускають крізь фільтр попереднього очищення (Ф-2), фільтруючим матеріалом якого є поліолефінові волокна. Швидкість фільтрування становить 2 м/с, а ефективність очищення сягає 90%.

##### *ДР 1.3. Компресування повітря*

Повітря стискають компресором (К-3) Atlas Copco GX 3EP PACK, продуктивність якого становить 5,3 л/с, робочий тиск – 10 бар.

##### *ДР 1.4. Охолодження повітря й видалення з нього зайвої вологи*

Повітря охолоджують до 20-25°C у теплообміннику Bader BL3-020-16 (Т-4), а потім його подають до ресивера RB495.600.01 (Р-5) задля встановлення вологості на рівні 60%.

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.34 КР ПЗ</b>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докum.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<b>РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркцив</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Салімова Е.Г.</i>						
<i>Перевір.</i>		<i>Скροцька О.І.</i>					<b>57</b>	<b>89</b>
<i>Консультант</i>						<b>Кафедра БТМ</b>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>			<b>57</b>			

### *ДР 1.5. Нагрівання повітря*

Повітря нагрівають у теплообміннику Bader BL3-020-16 (Т-6) до температури, вищої за температуру культивування на 5-10 °С, тобто до 40°C.

### *ДР 1.6. Очищення повітря на головному фільтрі*

Повітря очищується в головному фільтрі (Ф-7), фільтрувальним матеріалом якого є скловолокно. Ефективність очищення становить 95%.

### *ДР 1.7. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі*

Повітря пропускають крізь фільтр тонкого очищення повітря (Ф-25) зі скловолокна, ефективність очищення сягає 99,99%.

## ***ДР 2. Приготування розчину для підтримання рН***

### *ДР 2.1 Приготування 50%-го розчину фосфорної кислоти*

#### *ДР 2.1.1 Приготування 50%-го розчину фосфорної кислоти для стабілізації рН середовища при культивуванні в ферментері об'ємом 10 л*

Для приготування стерильного 50%-го розчину  $\text{H}_3\text{PO}_4$  потрібно передбачити підготовку стерильної води. Для підтримання рН середовища на рівні 7,2 треба приготувати 200 мл 50%-го розчину  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Для цього під витяжною шафою у стерильну колбу об'ємом 250 мл (Кб-8) за допомогою стерильного мірного циліндру об'ємом 250 мл наливають 110 мл стерильної води. Потім, використовуючи стерильний мірний циліндр об'ємом 100 мл, за постійного перемішування у ту ж колбу додають 93 мл 85%-го розчину  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Перемішавши вміст колби, її закривають скляним корком.

## ***ДР 3. Приготування та стерилізація запасних розчинів***

### *ДР 3.1 Приготування та стерилізація запасних розчинів для вирощування інокуляту в колбах на качалці та ферментері об'ємом 10 л*

#### *ДР 3.1.1 Приготування та стерилізація запасного розчину мікроелементів*

На технічних терезах зважують 2 г  $\text{CaCl}_2$  і 1 г  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Наважки поміщають у колбу об'ємом 250 мл (Кб-9), додають 100 мл питної води, перемішують і закривають ватно-марлевим корком. Стерилізують в автоклаві 2840ELV WR (А-11) протягом 40 хв за таких параметрів: 131°C, 0,15 МПа.

*ДР 3.1.2 Приготування та стерилізація запасного розчину термолабільних сполук*

На технічних терезах зважують 10 г гідрохлориду цистеїну, 1 г ніацину, 17 г тирозину. Наважки вносять у колбу об'ємом 500 мл (Кб-10), за допомогою мірного циліндру об'ємом 500 мл додають 250 мл питної води, перемішують і закривають ватно-марлевым корком. Стерилізують в автоклаві (А-11) протягом 30 хв за таких параметрів: 112°C, 0,05 МПа.

#### ***ДР 4. Приготування та стерилізація поживних середовищ***

*ДР 4.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці*

Розрахунок необхідних кількостей складових для приготування середовища для культивування посівного матеріалу в колбах на качалках наведений у табл. 6.1.

Таблиця 6.1.

### **Композиції для стерилізації компонентів для культивування посівного матеріалу в колбах на качалці**

<b>Компонент поживного середовища</b>	<b>Вміст, г/л</b>	<b>Кількість для приготування 0,6 л поживного середовища, г</b>	<b>Композиції</b>	<b>Об'єм композиції, V, л</b>
Пролін	1,04	0,624	А	0,15
Аскорбінова кислота	0,4	0,24		
Глутатіон	0,15	0,09		
Аланін	0,312	0,1872		
Аспарагінова кислота	0,436	0,2616		
Глутамінова кислота	1,6	0,96		
Гістидин	0,188	0,1128		
Гліцин	0,163	0,0978		
Ізолейцин	0,288	0,1728		
Лейцин	0,484	0,2904		
Метіонін	0,156	0,0936		
Фенілаланін	0,25	0,15		
Серин	0,23	0,138		

Закінчення табл. 6.1

Валін	0,456	0,2736		
Вода		150 (мл)		
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	0,5	0,3	Б	0,05
Вода		50 (мл)		
Глутамат натрію	20	12	В	0,4
Гідрохлорид лізину	0,6	0,36		
Трис(гідроксиметил)амінометан	6,1	3,66		
Диметил – β – циклодекстрин	1	0,6		
NaCl	2,5	1,5		
KCl	0,2	0,12		
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1	0,06		
Вода		400 (мл)		
<b>Усього</b>				

#### *ДР 4.1.1 Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних терезах зважують 0,6 г проліну, 0,2 г аскорбінової кислоти, 0,1 г глутатіону, 0,2 г аланіну, 0,3 г аспарагінової кислоти, 1 г глутамінової кислоти, 0,1 г гістидину, 0,1 г гліцину, 0,2 г ізолейцину, 0,3 г лейцину, 0,1 г метіоніну, 0,2 г фенілаланіну, 0,1 г серину, 0,3 валіну. Наважки вносять у колбу об'ємом 1 л (Кб-12), за допомогою мірного циліндру на 250 мл додають 150 мл питної води, перемішують і закривають ватно-марлевым корком. Стерилізують в автоклаві (А-15) протягом 30 хв за таких параметрів: 112 °С, 0,05 МПа.

#### *ДР 4.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних терезах зважують 0,3 г КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>. Наважку вносять у колбу об'ємом 100 мл (Кб-13), за допомогою мірного циліндру на 100 мл додають 50 мл питної води, перемішують і закривають ватно-марлевым корком. Стерилізують в автоклаві (А-15) протягом 40 хв за таких параметрів: 131°С, 0,15 МПа.

#### *ДР 4.1.3 Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних терезах зважують 12 г глутамату натрію, 0,4 гідрохлориду лізину, 4 г трис(гідроксиметил)амінометану, 0,6 г диметил- β – циклодекстрину, 1,5 г NaCl, 0,1 г KCl, 0,1 г MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O. Наважки вносять у колбу об'ємом 750 мл (Кб-

14), за допомогою мірного циліндру на 500 мл додають 400 мл питної води, перемішують і закривають ватно-марлевым корком. Стерилізують в автоклаві (А-15) протягом 40 хв за таких параметрів: 131°C, 0,15 МПа.

*ДР 4.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 10 л*

Розрахунок необхідних кількостей складових для приготування середовища для культивування посівного матеріалу у ферментері об'ємом 10 л наведений у табл. 6.2.

Таблиця 6.2.

**Композиції для стерилізації компонентів для культивування посівного матеріалу у ферментері об'ємом 10 л (Кз = 0,6)**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 6 л поживного середовища, г	Композиції	Об'єм композиції, V, л
Пролін	1,04	6,24	А	1,5
Аскорбінова кислота	0,4	2,4		
Глутатіон	0,15	0,9		
Аланін	0,312	1,872		
Аспарагінова кислота	0,436	2,616		
Глутамінова кислота	1,6	9,6		
Гістидин	0,188	1,128		
Гліцин	0,163	0,978		
Ізолейцин	0,288	1,728		
Лейцин	0,484	2,904		
Метіонін	0,156	0,936		
Фенілаланін	0,25	1,5		
Серин	0,23	1,38		
Валін	0,456	2,736		
Вода		1,5		
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	0,5	3	Б	0,5
Вода		500 (мл)		
Глутамат натрію	20	120	В	3,4
Гідрохлорид лізину	0,6	3,6		

Трис(гідроксиметил)амінометан	6,1	36,6		
Диметил – $\beta$ – циклодекстрин	1	6		
NaCl	2,5	15		
KCl	0,2	1,2		
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1	0,6		
Вода		3,4		
<b>Усього</b>				5,4

#### *ДР 4.2.1 Приготування та стерилізація композиції А*

На технічних терезах зважують 6,2 г проліну, 2,4 г аскорбінової кислоти, 1 г глутатіону, 2 г аланіну, 2,6 г аспарагінової кислоти, 9,6 г глютамінової кислоти, 1,1 г гістидину, 1 г гліцину, 1,7 ізолейцину, 3 г лейцину, 1 г метіоніну, 1,5 г фенілаланіну, 1,4 г серину, 2,7 валіну. Наважки вносять у колбу об'ємом 2 л (Кб-16) за допомогою мірного циліндру додають 1,5 л питної води, перемішують і закривають ватно-марлевым корком. Стерилізують в автоклаві (А-19) протягом 30 хв за таких параметрів: 112 °С, 0,05 МПа.

#### *ДР 4.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б*

На технічних терезах зважують 3 г КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>. Наважку вносять у колбу об'ємом 1 л (Кб-17), за допомогою мірного циліндру на 1 л додають 500 мл питної води, перемішують і закривають ватно-марлевым корком. Стерилізують в автоклаві (А-19) протягом 40 хв за таких параметрів: 131°С, 0,15 МПа.

#### *ДР 4.2.3 Приготування та стерилізація композиції В*

На технічних терезах зважують 120 г глютаму натрію, 3,6 гідрохлориду лізину, 37 г трис(гідроксиметил)амінометану, 6 г диметил –  $\beta$  – циклодекстрину, 15 г NaCl, 1,2 г KCl, 0,6 г MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O. Наважки вносять у колбу об'ємом 5 л (Кб-18), за допомогою мірного циліндру додають 3,4 л питної води, перемішують і закривають ватно-марлевым корком. Стерилізують в автоклаві (А-19) протягом 40 хв за таких параметрів: 131°С, 0,15 МПа.

### *ТП 5. Підготовка посівного матеріалу*

#### *ТП 5.1 Підтримання колекційної культури*

Отриману колекційну культуру *Bordetella pertussis* Tohama I зберігають у флаконах у ліофілізованому стані за температури нижчої, ніж 5 °С. Зі зниженням температури клітини краще зберігаються. Не рекомендується зберігати ліофілізовані культури за кімнатної температури. Всі роботи з колекційною культурою проводять строго в асептичних умовах.

#### *ТП 5.2. Одержання робочої культури*

Спочатку потрібно реактивувати культуру. З цією метою ліофілізовану культуру перетворюють на суспензію одразу після відкриття ампул, додаючи до кожної 0,3-1,0 мл стерильного рідкого середовища Борде-Жангу чи казеїново-вугільного агару (КВА). Суспензію в ампулах ретельно перемішують і переносять у пробірки з 5 мл рідкого середовища. Після перемішування відбирають 0,2 мл суспензії і методом виснажувального штриха пересівають на чашку Петрі з КВА або середовищем Борде-Жангу для одержання ізольованих колоній. Культивують у термостаті за температури 35-36°C протягом 48-72 год.

#### *ТП 5.3. Вирощування культури на щільному середовищі*

Одержані ізольовані колонії з чашки Петрі (від ТП 5.2) пересівають петлею у пробірки з аналогічним поживним середовищем (одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки). Культивують у термостаті за температури 35-36°C протягом 44-48 год.

#### *ТП 5.4. Вирощування культури в колбах на качалці*

В асептичних умовах у колбу об'ємом 1 л (Кб-12) зі стерильною композицією А (від ДР 4.1.1) зливають простерилізовані композиції Б (від ДР 4.1.2) і В (від ДР 4.1.3), а також два стерильні запасні розчини (мікроелементів і термолабільних сполук) об'ємом по 600 мкл кожен (від ДР 3.1.1 і 3.1.2); перемішують і розливають по 150 мл у 4 качалочні колби об'ємом 750 мл кожна (Кб-20, Кб-21, Кб-22, Кб-23).

У пробірку з робочою культурою *Bordetella pertussis* Tohama I (від ТП 5.3) вносять 5 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у качалочні колби з поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну

суспензію, одержану з однієї пробірки. Культивують на качалках (Кч-24) (150 об/хв) за температури 35 °С протягом 24 год.

Мікробіологічний контроль культури здійснюють шляхом мікроскопіювання, а також висіву на агаризоване середовище Борде-Жангу чи КВА. Якщо сторонньої мікрофлори не виявлено, культуральну рідину з чотирьох качалочних колб зливають у засівну колбу об'ємом 1 л і використовують для внесення у ферментер (Фр-27).

#### *ТП 6. Виробничий біосинтез*

##### *ТП 6.1 Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10 л*

Виробниче культивування здійснюють у ферментері Biostat Cplus (Фр-27) об'ємом 10 л ( $Kz = 0,6$ ), в який вносять 1,5 л розчину композиції А (від ДР 4.2.1), 500 мл розчину композиції Б (від ДР 4.2.2), 3,4 л розчину композиції В (від ДР 4.2.3) і два стерильні запасні розчини (мікроелементів і термолабільних сполук) (від ДР 3.1.1 і 3.1.2) об'ємом по 6 мл кожен. Додають 6 мл стерильного 50% розчину фосфорної кислоти (від ДР 2.1.1).

З дотриманням асептичних умов вносять інокулят із колб (від ТП 5.4). Вмикають перемішувальний пристрій і подають стерильне аераційне повітря за допомогою барботера.

Виробничий біосинтез триває 39 год за температури 35°C і рН 7,2. Частота обертів перемішувального пристрою становить 500 об/хв. Культивування зупиняють при досягненні концентрації кашлюкового токсину 0,0225 г/л.

Під час культивування кожні 4-8 год відбирають проби для мікробіологічного контролю.

Після біосинтезу культуральна рідина надходить на стадію одержання анатоксину [43].

**РОЗДІЛ 7**  
**КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА**

Таблиця 7.1

**Карта постадійного контролю біосинтезу кашлюкового токсину**

<i>Номер точки контролю й назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю й показник, який визначають</i>	<i>Засоби й методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки й відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Кт 1.2 <i>Грубе очищення повітря</i>	<b>Повітря на виході з фільтра грубого очищення</b> ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення відповідно до паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 90 %, тиск згідно з паспортом
Кт 1.3 <i>Компресування повітря</i>	<b>Стиснене повітря</b> температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P = 0,35-0,5 МПа t = 220-250 °C
Кт 1.4 <i>Охолодження повітря й видалення з нього зайвої вологи</i>	<b>Охолоджене повітря</b> температура <b>Повітря після видалення зайвої вологи</b> вологість	Термометр технічний, психрометричний метод	Після охолодження повітря, після видалення з нього зайвої вологи	t = 25-40 °C W = 60 %
Кт 1.5 <i>Нагрівання повітря</i>	<b>Нагріте повітря</b> температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 40 °C

<b>НУХТ БТЕК 04.01.34 КР ПЗ</b>				
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ док.м.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Салімова Е.Г.</i>		
<i>Перевір.</i>		<i>Скряцька О.І.</i>		
<i>Консультант</i>				
<i>Н. Контр.</i>				
<i>Затверд.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>		
<b>РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва</b>			<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>
				<b>65</b>
			<b>Кафедра БТМ</b>	<b>65</b>

Продовження табл. 7.1

Кт 1.6 <i>Очищення повітря на головному фільтрі</i>	<b>Очищене повітря</b> ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно з паспортом фільтра	Після очищення повітря на головному фільтрі	E = 95 %
Кт 1.7 <i>Очищення повітря на індивідуальному фільтрі</i>	<b>Очищене повітря</b> ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення відповідно до паспорту фільтра	Під час очищення повітря на індивідуальному фільтрі	E = 99,999 %
Кх 2.1, 2.1.1 <i>Приготування 50%-го розчину фосфорної кислоти</i>	<b>Розчин фосфорної кислоти</b> Концентрація	Фотоколориметр	Концентрацію визначають після приготування розчину	C = 50%
Кх, Кт, Км 3.1, 3.1.1 Приготування та стерилізація запасного розчину мікроелементів	<b>Запасний розчин мікроелементів</b> <b>Температура, час, тиск, стерильність</b>	Термометр, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температуру визначають безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131°C, τ = 40 хв, відсутність мікробіоти P = 0,15 МПа, відсутність мікробіоти
Кх, Кт, Км 3.1, 3.1.2 Приготування та стерилізація запасного розчину термолабільних сполук	<b>Запасний розчин термолабільних сполук</b> <b>Температура, час, тиск, стерильність</b>	Термометр, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температуру визначають безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °C, τ = 30 хв, P = 0,05 МПа, відсутність мікробіоти

<p>Кх, Кт, Км 4.1, 4.1.1</p> <p>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці</p> <p>Приготування та стерилізація композиції А</p>	<p><b>Композиція А</b></p> <p><b>Температура, час, тиск, стерильність</b></p>	<p>Термометр, годинник, манометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температуру визначають безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 30\text{ хв}</math>, <math>P = 0,05\text{ МПа}</math>, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кх, Кт, Км 4.2, 4.2.1</p> <p><i>Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 10 л</i></p> <p><i>Приготування та стерилізація композиції А</i></p>	<p><b>Композиція А</b></p> <p>Температура, час, тиск, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, манометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температуру визначають безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 30\text{ хв}</math>, <math>P = 0,05\text{ Мпа}</math>, відсутність мікробіоти</p>

<p>Кх, Кт, Км 4.1, 4.1.2</p> <p><i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вироцування інокуляту в колбах на качалці</i></p> <p><i>Приготування та стерилізація композиції Б</i></p>	<p><b>Композиція Б</b></p> <p>Температура, час, тиск, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, манометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температуру визначають безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 40\text{ хв}</math>, <math>P = 0,15\text{ МПа}</math>, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кх, Кт, Км 4.2, 4.2.2</p> <p><i>Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 10 л</i></p> <p><i>Приготування та стерилізація композиції Б</i></p>	<p><b>Композиція Б</b></p> <p>Температура, час, тиск, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, манометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температуру визначають безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 30\text{ хв}</math>, <math>P = 0,05\text{ МПа}</math>, відсутність мікробіоти</p>

<p>Кх, Кт, Км 4.1, 4.1.3</p> <p><i>Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці</i></p> <p><i>Приготування та стерилізація композиції В</i></p>	<p><b>Композиція В</b> Температура, час, тиск, стерильність</p>	<p>Термометр, годинник, манометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температуру визначають безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 40\text{ хв}</math>, <math>P = 0,15\text{ МПа}</math>, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кх, Кт, Км 4.2, 4.2.3</p> <p>Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментера об'ємом 10 л</p> <p>Приготування та стерилізація композиції В</p>	<p><b>Композиція В</b> <b>Температура, час, тиск, стерильність</b></p>	<p>Термометр, годинник, манометр, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температуру визначають безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації</p>	<p><math>t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}</math>, <math>\tau = 40\text{ хв}</math>, <math>P = 0,15\text{ МПа}</math>, відсутність мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.1</p> <p><i>Підтримання колекційної культури</i></p>	<p><b>Колекційна культура</b> <b><i>Bordetella pertussis</i> Tohama I</b> Температура, ліофілізований стан</p>	<p>Термометр</p>	<p>Ліофільно висушені культури зберігаються понад 5-6 років без втрати фізіологічних властивостей</p>	<p><math>t &lt; 5^{\circ}\text{C}</math>, ліофілізований стан</p>

Кт, Км 5.2 <i>Одержання робочої культури</i>	<b>Колекційна культура <i>Bordetella pertussis Tohama</i> I</b> Температура, час, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль здійснюють кожні 8 год	t = 35-36 °С, τ = 48-72 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.3 <i>Вирощування культури на щільному середовищі</i>	<b>Колекційна культура <i>Bordetella pertussis Tohama</i> I</b> Температура, час, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль здійснюють кожні 8 год	t = 35-36 °С, τ = 44-48 год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 5.4 <i>Вирощування культури в колбах на качалці</i>	<b>Посівний матеріал</b> Температура, тривалість культивування, частота обертів качалки, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, тахометр мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично протягом всього часу вирощування, мікроскопіювання здійснюють кожні 8 годин	t = 35°С, τ = 24 год, ω = 150 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

<p>Кх, Кт, Км 6.1  <i>Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10 л</i></p>	<p><b>Культуральна рідина</b>          Температура, тривалість культивування, значення рН, частота обертів мішалки, рівень піни, відсутність сторонньої мікробіоти, концентрація кашлюкового токсину</p>	<p>Термометр, годинник, тахометр, датчик рН, датчик піноутворення, мікроскоп</p>	<p>Температура, швидкість обертання мішалки, значення рН, рівень піни контролюються і підтримуються автоматично протягом усього часу культивування; мікроскопіювання здійснюють кожні 8 годин</p>	<p><math>t = 35^{\circ}\text{C}</math>,  <math>\tau = 39</math> год,  <math>\text{pH} = 7,2</math>,  <math>\omega = 500</math> об/хв,          відсутність сторонньої мікробіоти</p>
--	--	--	---	--

З метою мікробіологічного контролю (визначення загальної кількості клітин, визначення кількості живих клітин, визначення концентрації вуглецю й азоту, контролю рН клітинної суспензії) кожні 4-8 годин протягом усього процесу культивування з ферментера відбирають проби культуральної рідини для аналізу.

### 7.1. Мікробіологічний контроль

Оскільки культивування бактерій *Bordetella pertussis* Tohama I з метою одержання кашлюкового токсину відбувається в асептичних умовах, то потрібно здійснювати мікробіологічний контроль на всіх етапах, аби впевнитись у відсутності сторонньої мікробіоти.

Мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища відбувається шляхом розсівання проби (50 мл) простерилізованого поживного середовища (або стерильної композиції поживного середовища перед змішуванням) на чашки Петрі з відповідним агаризованим поживним середовищем, а саме з сусло-агаром (СА) –

для виявлення грибів і дріжджів та м'ясо-пептонним агаром (МПА) – для виявлення бактерій. Потім здійснюється інкубування.

*Підготовка чашок Петрі.* У завчасно простерилізовані в сухожаровій шафі чашки Петрі наливають по 20-30 мл розплавлені на киплячій водяній бані агаризовані середовища: СА (сусло-агар) і МПА (м'ясо-пептонний агар). Чашки залишають на рівній поверхні задля рівномірного застигання агару і витримують протягом 2-3 діб за температури 30 °С кришками донизу.

*Виконання посівів.* Посіви здійснюють шляхом відбору 0,1 мл з об'єму проби стерильною піпеткою і нанесення її на поверхню СА чи МПА. Суспензію рівномірно розподіляють по поверхні середовища за допомогою стерильної бактеріологічної петлі або стерильного шпателя Дригальського. Чашки з посівами загортають у папір і поміщають у термостат за температури 30...32°C. Посіви аналізують з 6...8 години. На поверхні поживних середовищ візуально визначають відсутність ознак росту мікроорганізмів [44].

**Мікробіологічний контроль чистоти культури** здійснюють двома шляхами: прямим висівом на агаризовані поживні середовища та мікроскопіюванням.

Класичними середовищами для культивування збудника кашлюку є казеїново-вугільний агар (КВА), картопляно-гліцеринний агар з кров'ю, пеніциліном або цефалоспорином (середовище Борде-Жангу), вугільно-кров'яний агар (середовище Реган-Лоу), молочно-кров'яний агар. На КВА колонії дрібні, мають округлу куполоподібну форму, сметаноподібну консистенцію та сірувато-кремовий колір. (рис. 7.1). Розмір колоній – 0,5-1,0 мкм [17, 20].



Рис. 7.1. Колонії *B. pertussis* на КВА [45]

На середовищі Борде-Жангу за 2-5 днів вирощування з'являються колонії *B. pertussis*: гладкі, опуклі, вологі, сірі з перламутровим блиском, зі слабкою зоною гемолізу. Вони нагадують дрібні краплинки ртуті чи перлинки (рис. 5.2) [17, 20].



Рис. 7.2. Колонії *B. pertussis* на середовищі Борде-Жангу [45]

Мікроскопіювання здійснюють у світловому мікроскопі з імерсійною системою. З дотриманням асептичних умов, стерильною бактеріальною петлею на чисте знежирене предметне скельце наносять краплю фізіологічного розчину і невелику краплину культуральної рідини. Петлею розподіляють краплину по скельцю (діаметр мазка приблизно 1 см). Висушування мазка здійснюють за

кімтантної температури, фіксацію – у полум'ї спиртівки. Далі мазок фарбують за Грамом: фіксований мазок накривають шматочком фільтрувального паперу, наносять на нього карболовий розчин генціанвіолету й витримують 1-2 хв. Папірець знімають, барвник зливають і, не змиваючи водою, обробляють мазок розчином Люголя до почорніння (1-2 хв). Зливають розчин Люголя, зафарбований мазок знебарвлюють 96%-им етиловим спиртом (30 секунд). Препарат промивають водою. Протягом 1-2 хв мазок додатково забарвлюють водним розчином фуксину. Барвник зливають, препарат промивають водою, висушують фільтрувальним папірцем і мікроскопують з імерсійною системою: на сухий препарат скляною паличкою наносять 1–2 краплини імерсійної олії. Після мікроскопіювання знімають залишки олії з імерсійного об'єктива за допомогою вати, змоченої етиловим спиртом [46].

У випадку відсутності сторонньої мікрофлори під час мікроскопіювання можна побачити бактерії *Bordetella pertussis* Tohama I – нерухливі палички з заокругленими кінцями, що забарвлюються за Грамом негативно в рожевий або червоний колір (рис. 5.3). Діаметр їхніх клітин становить  $0,2-0,5 \times 0,5-1$  мкм [17]. У мазках розташовуються поодинокі, рідше – попарно [18]. Ці бактерії не утворюють спор, не мають джгутиків, але утворюють капсулу (рис. 5.4) [20].

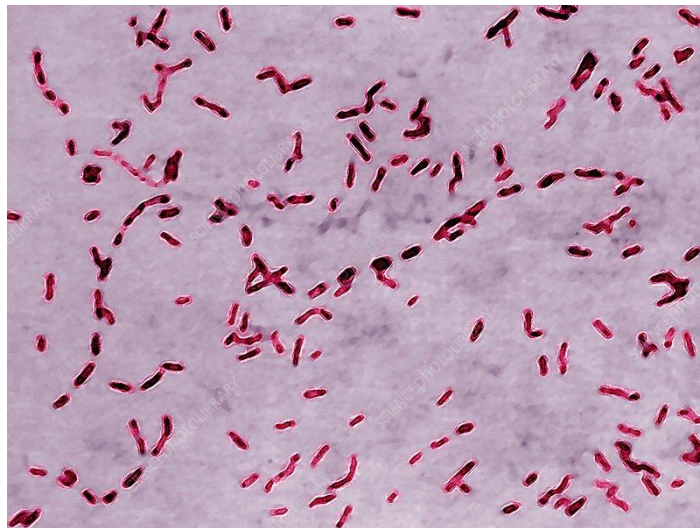


Рис. 7.3. Грам-негативні клітини *B. pertussis* під світловим мікроскопом [47]

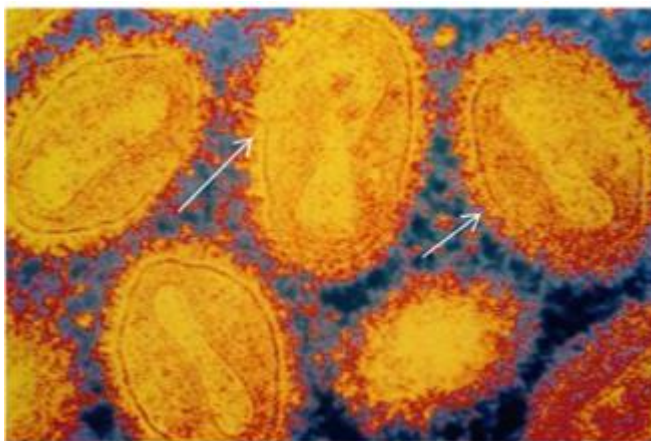


Рис. 7.4. Капсули *B. pertussis* [21]

## 7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

### 7.2.1. Концентрація біомаси

Рівень біомаси контролюють за допомогою фізико-хімічного методу аналізу – спектрофотометрії. Концентрацію біомаси визначали шляхом вимірювання оптичної густини за 540 нм [48], використовуючи Vitalab 10 (Vital Scientific, Dieren, Нідерланди) [36].

**Здійснення аналізу.** Для вимірювання оптичної густини зразки розводили 0,85% NaCl, щоб отримати значення від 0,1 до 0,6. 1 OD відповідає 0,5 г/л біомаси [48]. Суху масу визначали центрифугуванням за 8000 об/хв протягом 10 хв із використанням усього об'єму культури (200 мл) після того як оптична густина досягла сталого значення або зменшилась. Осади клітин містили <0,5% води через 24 год за 80°C – це було визначено аналізатором вологості Mitsubishi (Mitsubishi, Токіо, Японія) [49].

**Обладнання** та його технічні характеристики наведено нижче.



Рис. 7.5. Спектрофотометр Vitalab 10 [36]

Це універсальний фотометр з фільтром, який застосовується для вимірювання пропускання, поглинання та концентрації. Використовується в рутинних клінічних та промислових дослідженнях.

**Основні технічні характеристики:**

- автоматичне обнулення та калібрування;
- довжина хвилі – 330-1000 нм;
- застосовується для кювет на 10 мм;
- 220 В, 50 Гц, 40 ВА;
- корпус (Д) x (В) x (Ш): 27,5 x 14 x 31,5 см [50].

**7.2.2. Концентрація цільового продукту**

Концентрацію кашлюкового токсину визначали за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) в супернатантах культуральної рідини, які було отримано шляхом центрифугування (5000 об/хв, 10 хв.) [51].

**Принцип методу.** ІФА – це чутливий аналітичний біохімічний метод, який використовується для визначення та кількісного чи якісного аналізу речовини без використання складного, дорогого обладнання. Під час проведення цього аналізу рідкий зразок додають на нерухому тверду фазу всередині реакційної камери чи лунки мікропланшету. Потім різні рідкі реагенти послідовно інкубуються, що

призводить до появи кольору продукту ферментативної реакції. Результати зчитуються на спектрофотометрі за 400-600 нм [52].

**Здійснення аналізу.** В лунки полістиролового мікротитраційного планшету (4-39454; Nunc) вносили 100 мкл очищеної поліклональної протикашлюкової антисироватки морських свинок (розведення 1:16000 у 50 мМ карбонатному буфері, рН 9,6) вночі за температури 4 °С. Планшет тричі промивали DPBST (фосфатно-сольовий буфер Dubelcco без Ca і Mg, що містить 0,1% об./Об. Tween 20). Потім у кожну лунку додавали серійні розведення очищених стандартів кашлюкового токсину та культуральних супернатантів (в DPBST) (100 мкл на лунку). Після інкубації протягом 30 хв за кімнатної температури планшет тричі промивали DPBST. Потім у кожну лунку додавали козячу сироватку проти кашлюку (розведення 1:500 в DPBST) і сироватку морської свинки (розведення 1:1000 в DPBST) (100 мкл на лунку). Після 30-хвилинної інкубації за кімнатної температури планшет тричі промивали DPBST. Потім у кожну лунку додавали кролячий антикозячий імуноглобулін G (Rabbit anti-goat immunoglobulin G), кон'югований з лужною фосфатазою (Zymed; розведення 1:1000 в DPBST) (100 мкл на лунку). Після інкубації протягом 30 хв за кімнатної температури планшет тричі промивали DPBST. Речовини у планшеті виявляли додаванням 10 г/л розчину п-нітрофенілфосфату (Calbiochem) в діетаноламіновому буфері (діетаноламін 9,7% об./Об., азид натрію 0,2 г/л,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0,214 г/л, рН 9,8) в кожну лунку (100 мкл на лунку). Поява забарвлення відбувалася за кімнатної температури, процес зупиняли додаванням 50 мкл 3 М NaOH у кожну лунку. Оптичну густина речовини з лунок вимірювали за допомогою зчитувального пристрою для мікропланшетів Versamax (Molecular Devices) за довжини хвилі 405 нм через годину після додавання NaOH [51].

**Обладнання для здійснення аналізу:**



Рис. 7.6. Планшетний фотометр Multiskan FC [53]

Планшетний фотометр Multiskan FC із вбудованим шейкером підходить для використання планшетів на 96 лунок та має широкий спектральний діапазон – 340-850 нм. Планшетний фотометр виготовлений із якісних матеріалів, має кольоровий екран, вирізняється надійністю та довготривалістю своєї роботи. Цей прилад вирізняється легким управлінням і швидкістю налаштувань для виконання завдань. Вбудоване програмне забезпечення дозволяє зберігати результати на персональному комп'ютері у форматі таблиць Excel. Є звичайні та прискорені режими роботи від 6 секунд для планшета на 96 лунок. Управління пристроєм відбувається або з плівкової клавіатури, або з підключеного комп'ютера за допомогою програмного забезпечення ScanIt.

**Основні технічні характеристики приладу:**

- діапазон хвиль – 340-850 нм;
- джерело світла – кварцево-галогенна лампа (Osram 64222, 6 I/10 Вт);
- світлофільтр – 8-позиційне коліщатко, встановлені фільтри: 405, 450, 620 нм;
- ширина смуги пропускання – 3-9 нм;
- шейкер вбудований, з лінійним струшуванням;
- швидкісний режим шейкера – повільний (5 Гц, діаметр 15 мм), середній (11 Гц, діаметр 3 мм) і швидкий (20 Гц, діаметр 1 мм);

- розміри: 290 x 400 x 210 мм;
- маса – 8,5 кг [53].

### 7.2.3. Концентрація джерела вуглецю і азоту

До складу поживного середовища для культивування *Bordetella pertussis* Tohama I входить велика кількість глутамату, який є одночасно джерелом і вуглецю, й азоту.

Концентрацію глутамату визначали за допомогою методу спектрофотометрії.

**Принцип методу.** Визначення L-глутамату з використанням L-глутамат оксидази, що діє виключно на L-глутамат. Аскорбінова кислота (вітамін С) видаляється із зразків оксидазою аскорбінової кислоти в розчині реагенту ферменту R1. Згодом L-глутамат оксидаза в розчині реагенту ферменту R2 окиснює L-глутамат, і утворюється пероксид водню. Фіолетовий барвник утворюється з TOOS (N-етил-N-(2-гідрокси-3-сульфопропіл)-3-метиланіліну), а 4-аміноантипирин (4-AA) окиснюється пероксидазою.

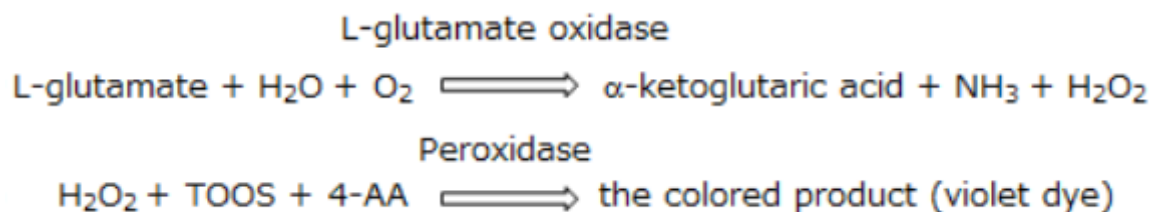


Рис. 7.7. Реакції при визначенні глутамату [54]

**Пробопідготовка.** Для вимірювання концентрації глутамату зразки культур центрифугували при 12000 об/хв протягом 5 хв і пропускали крізь мембранний фільтр із розміром пор 0,45 мкм.

**Здійснення аналізу.** Зразки обробляли L-аскорбіновою оксидазою (5 од/мл) протягом 5 хв за кімнатної температури, щоб розщепити вітамін С (який інгібує реакцію L-глутамат-оксидази в аналізі L-глутамату Kit II (Yamasa, Co., Choushi, Японія)) у середовищі. Зразки розбавляли HEPES (4-(2-гідроксіетил)-1-піперазинетансульфонова кислота – буферний розчин цвіттер-іонної сульфонові кислоти; рН 7,1) від 1 до 40 разів, отримуючи концентрації глутамату у відповідному для вимірювання діапазоні концентрацій (0,05 мМ - 3 мМ). 15 мкл

розчинів додавали в 96-лункові планшети, що містять 225 мкл суміші фермент-реагент. Після змішування їх інкубували за кімнатної температури протягом 20 хв. 100 мкл реакційної суміші вимірювали за допомогою мікропланшетного зчитувача (iMARK, Bio-Rad, Hercules, CA), довжина хвилі становила 595 нм. Концентрації глутамату у зразках визначали за методом калібрувальної кривої [55].

**Обладнання для здійснення аналізу:**



Рис. 7.8. Мікропланшетний зчитувач iMARK [56]

Технічні характеристики приладу:

- Діапазон довжин хвиль: 400–750 нм;
- Фотометричний діапазон: 0,0–3,5 OD;
- Лінійність:  $\leq 1,0\%$ : від 0,0–2,0 OD;  $\leq 2,0\%$  від 0,0–3,0 OD;
- Точність:  $\leq 1,0\%$  або 0,010 від 0,000–3,000 OD при 490 нм;
- Точність: 1,0% або 0,005 OD від 0,0–2,0 OD; 1,5% від 2,0–3,0 OD;
- Роздільна здатність: 0,001 OD;
- Струшування пластини (3 рівні швидкості): низький, середній, високий;
- Тривалість, сек: 0–999;

- Час зчитування: 6 секунд на одній довжині хвилі, 10 секунд на подвійній довжині хвилі;
- Виведення даних: вбудований графічний термопринтер та інтерфейс USB2 із станціями передачі даних ПК;
- Багатомовна підтримка (4 мови);
- Розміри (Ш x Д x В), см: 34,6 x 37,7 x 16,4;
- Вага, кг: 5,5 [56].

До складу поживного середовища для культивування *Bordetella pertussis* Тоhана I входить велика кількість глутамату, який є одночасно джерелом і вуглецю, й азоту.

Амінний азот визначають за допомогою методу формольного титрування.

**Принцип методу** полягає у блокуванні формальдегідом вільних аміногруп при значенні рН 7,0 і титруванні лугом еквівалентної кількості карбоксильних груп. Початок і закінчення титрування визначають потенціометрично.

**Реактиви:** гідроксид натрію (0,1 моль/л) або розчин соляної кислоти (0,1 моль/л); 10%-ий розчин гідроксиду натрію; розчин формаліну (40%-ий розчин формальдегіду).

**Обладнання:** бюретки для титрування об'ємом 5 мл, колби, піпетки.

**Хід визначення.** У хімічну склянку об'ємом 50 мл наливають 10 мл досліджуваної проби. Електроди потенціометра поміщають у досліджуваний розчин, рН якого доводять до значення 7,0 за допомогою розчину гідроксиду натрію (0,1 моль/л) чи соляної кислоти (0,1 моль/л). До нейтралізованої проби додають 2 мл нейтрального формаліну, перемішують і, не виймаючи електроди, титрують зміст розчином гідроксиду натрію (0,1 моль/л) до значення рН 9,1. Здійснюють два паралельні виміри. Вміст амінного азоту (X) у відсотках розраховують за формулою:

$$X = \frac{V \cdot K \cdot 1,4 \cdot 100}{A \cdot 1000}$$

A – об'єм досліджуваної проби, мл;

$V$  – кількість розчину гідроксиду натрію, що витратився на титрування, мл;

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

1,4 – кількість амінного азоту в міліграмах, еквівалентна 1 мл розчину гідроксиду натрію;

100 – коефіцієнт перерахунку мг у %;

1000 – коефіцієнт перерахунку мг у г [57].

## ЛІТЕРАТУРА

1. Pollard A. J., Bijker E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*. 2021, 21(2): 83-100. doi:10.1038/s41577-020-00479-7
2. Kennedy R.B., Ovsyannikova I.G., Palese P., Poland G.A. Current Challenges in Vaccinology. *Front Immunol*. 2020, 11: 1181. doi: 10.3389/fimmu.2020.01181
3. Spector T.B., Maziarz E.K. Pertussis. *Med. Clin. North. Am.* 2013, 97(4): 537-52. doi: 10.1016/j.mcna.2013.02.004.
4. Polinori I., Esposito S. Clinical Findings and Management of Pertussis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019, 1183: 151-160. doi:10.1007/5584\_2019\_410
5. Ausiello C. M., Mascart F., Corbière V., Fedele G. Human Immune Responses to Pertussis Vaccines. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1183: 99-113. doi:10.1007/5584\_2019\_406
6. Борисова И.Э., Селезнева Т.С. Современное представление об антигенах коклюшного микроба и их роли в патогенезе и диагностике коклюшной инфекции. *Современные достижения в лечении социально значимых заболеваний*. 13 (3): 237-242
7. Маянский А.Н. Патогенетическая микробиология: руководство. Нижний Новгород: Издательство НижГМА, 2006. – 520 с.
8. Stein P.E., Boodhoo A., Armstrong G.D., Cockle S.A., Klein M.H., Read R.J. The crystal structure of pertussis toxine. *Current Biology Ltd*. 1994, 2(1): 45-57. doi:10.1016/s0969-2126(00)00007-1
9. Попова О.П. Коклюш у детей: клинико-иммунологические аспекты, диагностика и лечение: Дис. д-ра мед. наук. Москва, 2014. 302 с.
10. Інфанрикс™ комбінована вакцина для профілактики дифтерії, правця, кашлюку ацелюлярна очищена інактивована рідка. [Електронний ресурс]. – Режим

					<b>НУХТ БТЕК 04.01.34 КР ПЗ</b>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Салімова Е.Г.</i>			<b>ЛІТЕРАТУРА</b>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Архів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Скороцька О.І.</i>					<b>83</b>	<b>89</b>
<i>Консультант</i>						83		
<i>Н. Контр.</i>						<b>Кафедра БТМ</b>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

доступу:

[http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[18343\]](http://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[18343])

11. Cherry J.D. The 112-year Odyssey of pertussis and pertussis vaccines – mistakes made and implications for the future. *JPIDS*. 2019, 8(4): 334-341. doi: 10.1093/jpids/piz005

12. Belcher T. Investigating the growth and metabolic difference of Bvg+ and Bvg- phase *Bordetella pertussis*: A thesis submitted for the degree of PhD. Bath, 2017. 160 p.

13. Xu Y., Tan Y., Asokanathan C., Zhang S., Xing D., Wang J. Characterization of co-purified acellular pertussis vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2015, 11(2): 421-427. doi: <http://dx.doi.org/10.4161/21645515.2014.988549>

14. Schure R.M., Hendrikx L.H., de Rond L.G.H., Öztürk, K., Sanders E.A.M., Berbers G.A.M. et al. T-cell responses before and after the fifth consecutive acellular pertussis vaccination in 4-year-old Dutch children. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2012, 19(11): 1879-1886. doi: 10.1128/CI.00277-12

15. Чудна Л.М., Задорожна В.І., Маричев І.Л., Демчишина І.В. Вакцинопрофілактика та її вплив на рівень захворюваності інфекціями, що керуються засобами специфічної імунопрофілактики. *Профілактична медицина*. 2013, 1-2(20): 3-11.

16. Burdin N., Handy L.K., Plotkin S.A. The problem of waning effectiveness of Pertussis vaccines. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2017, 9: 1-18. doi:10.1101/cshperspect.a029454

17. Быков А.С., Зверев В.В. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Атлас-руководство: Учебное пособие. – М.: Медицинское информационное агентство, 2018. – 416 с.

18. Характеристика возбудителя коклюша *Bordetella pertussis* и особенности эпидемиологии заболевания. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://microbak.ru/infekcionnye-zabolevaniya/koklyush/vozbutel.html>

19. Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Image Library. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=22874>
20. Павлович С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией: Учеб. пособие. – Минск: Выш. шк., 2013. – 799 с.
21. Литусов Н.В. Возбудители коклюша и паракоклюша: Иллюстрированное учебно-методическое пособие – Екатеринбург: Изд-во УГМА, 2013. – 32 с.
22. Mughal A., Vokhari H., Kazi Y.F. Diagnosis of pertussis in vaccinated children of Khairpur, Sindh, Pakistan by Cough Plate Method. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*. 2011, 1(2): 68-72
23. Черкес Ф.К., Богоявленская Л.Б., Бельская Н.А. Микробиология – М.: Медицина, 1986. – 512 с.
24. Хоулт Дж., Криг Н., Смит П., Стейли Дж., Уилльямс С. Определитель бактерий Берджи в 2 томах – М: Мир, 1997. – 746 с.
25. Ценева Г.Я., Курова Н.Н. Микробиологическая характеристика возбудителя коклюша и лабораторная диагностика коклюша. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2003, 4: 329-341
26. Борисова О.Ю., Алёшкин А.В., Ивашинникова Г.А., Донских Е.Е., Постникова Е.А., Алёшкин В.А. Чувствительность штаммов *Bordetella pertussis* к антибактериальным препаратам. *Детские инфекции*. 2013, 2: 46-50
27. Андрейчин А.М., Василишин З.П., Виноград Н.О., Гафарова М.Т., Глушко-Маківська А.П., Голубятников М.І. та ін. Епідеміологія: підручник для студ. вищих мед. навч. закладів. – Вінниця: Нова Книга, 2012. – 576 с.
28. Loeffelholz M.J., Sanden G.N. *Bordetella* 9th Edition. ASM Press. 2007. P. 803–814
29. Кашлюк. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/inshi-infekciyni-zakhvoryuvannya/krapelni-infekcii/kashlyuk>

30. Інфанрикс™ ІПВ комбінована вакцина для профілактики дифтерії, правця, кашлюку (ацелюлярний компонент) та поліомієліту. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=46023>

31. Заклади охорони здоров'я та захворюваність населення України у 2017 році. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat\\_u/2018/zb/06/zb\\_zoz\\_17.pdf](http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2018/zb/06/zb_zoz_17.pdf)

32. Демографічна ситуація в країні в 2013-2017 роках. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://pon.org.ua/novyny/6104-demografchna-situasya-v-krayin-u-2013-2017-rokah.html>.

33. Вакцинація дорослих: проти яких захворювань необхідно робити щеплення за Календарем профілактичних щеплень. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://moz.gov.ua/article/immunization/vakcinacija-doroslih-proti-jakih-zahvorjuvan-neobhidno-robiti-sheplennja-za-kalendarem-profilaktichnih-sheplen>

34. У яких країнах Україна закуповує вакцини [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://moz.gov.ua/article/immunization/u-jakih-krainah-ukraina-zakupovue-vakcini->

35. Branco dos S., Olivier B.G., Boele J, Smessaert V., De Rop P., Krumpochova P. et al. Probing the genome-scale metabolic landscape of *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017, 83(21): 1-45. doi: 10.1128/AEM.01528-17

36. Thalen M., Martens D.E., Tramper J. Fed-batch cultivation of *Bordetella pertussis*: Metabolism and Pertussis Toxin production. *Biologicals.* 2006, 34(4): 289-97. doi: 10.1016/j.biologicals.2005.12.001

37. Biostat Cplus. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://sartorius-sd.com.ua/index.php/%D1%81%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D1%83%D0%B5%D0%BC%D1%8B%D0%B5-%D0%BD%D0%B0-%D0%BC%D0%B5%D1%81%D1%82%D0%B5->

%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%80%D1%8B/biostat%C2%AE-cplus.html

38. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.

39. Засекін Д., Пушкова А., Димко Р. Сучасні вимоги до мийно-дезінфікуючих засобів [Електронний ресурс]. Режим доступу: [http://ena.lp.edu.ua:8080/bitstream/ntb/41918/2/2017\\_Zasiekin\\_D-Suchasni\\_vymohy\\_do\\_myino\\_dezinfikuiuchykh\\_74.pdf](http://ena.lp.edu.ua:8080/bitstream/ntb/41918/2/2017_Zasiekin_D-Suchasni_vymohy_do_myino_dezinfikuiuchykh_74.pdf)

40. Інструкція щодо застосування засобу Біомой [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/biomoj-metodicheskie-rekomendatsii-instruktsiya-po-primeneniyu/>

41. Інструкція щодо застосування засобу Дезактин [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%94%D0%B5%D0%B7%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B8%D0%BD/1013686/>

42. Інструкція щодо застосування засобу Хлорантоїн [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%A5%D0%BB%D0%BE%D1%80%D0%B0%D0%BD%D1%82%D0%BE%D0%B8%D0%BD/1038290/>

43. Краснопольский Ю.М., Борщевская М.И. Фармацевтическая биотехнология: Технология производства иммунобиологических препаратов: учеб. пособие. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2009. – 352 с.

44. 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.

45. Замазій Т.М., Коваленко Н.І. Збудники повітряно-краплинних бактеріальних інфекцій. Збудники коклюшу : метод. вказ. для студентів-магістрів II–III курсів спеціальності "Медицина", "Педіатрія" і "Стоматологія" освітньо-кваліфікаційного рівня – «Магістр» – Харків : ХНМУ, 2019. – 48 с.
46. Лысак В.В., Желдакова Р.А., Фомина О.В. Микробиология. Практикум: пособие. – Минск: БГУ, 2015. – 115 с.
47. *Bordetella pertussis*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sciencephoto.com/media/546606/view/bordetella-pertussis>
48. Budman H., Patel N., Tamer M., Al-Gherwi W. A dynamic metabolic flux balance based model of fed-batch fermentation of *Bordetella pertussis*. *Biotechnol Prog.* 2013, 29(2): 520-531. doi: 10.1002/btpr.1675
49. Thalen M, IJssel J, Jiskoot, Zomer B, Roholl P, Gooijer C. *et. al.* Rational medium design for *Bordetella pertussis*: basic metabolism. *Journal of Biotechnology.* 1999, 75: 147-159. doi: 10.1016/s0168-1656(99)00155-8
50. Vitalab 10 spectrophotometer. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.geminibv.com/labware/vitalab-10-spectrophotometer/>
51. Goffin P., Slock T., Smessaert V., De Rop P., Dehottay P. A versatile, non genetically modified organism (GMO)-based strategy for controlling low-producer mutants in *Bordetella pertussis* cultures using antigenic modulation. *Biotechnology Journal.* 2015, 10(8): 1269–1280. doi: 10.1002/biot.201400539
52. Konstantinou G. N. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol.* 2017, 1592: 79-94. doi: 10.1007/978-1-4939-6925-8\_7
53. ИФА анализатор Multiskan FC, с фильтрами 405, 450, 620 нм: [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.laboratorii.com/oborudovanie-dlja-laboratorij/planshetnye-fotometry/multiskan-fc/>
54. L-Glutamate KIT YAMASA NEO. [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://diagnostics.yamasa.com/en/reagent/80128\\_en/](https://diagnostics.yamasa.com/en/reagent/80128_en/)
55. Hanawa T., Kamachi K., Yonezawa H., Fukutomi T., Kawakami H., Kamiya S. Glutamate Limitation, BvgAS Activation and (p)ppGpp Regulate the Expression of the

*Bordetella pertussis* Type 3 Secretion System.. *Journal of Bacteriology*. 2016, 198 (2): 343-351. doi:10.1128/JB.00596-15

56. iMark™ Microplate Absorbance Reader. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.bio-rad.com/en-ua/product/imark-microplate-absorbance-reader?ID=58cca7aa-d943-4e32-9bea-0fe5d140fb9e>

57. Диагностика коклюша и паракоклюша: Методические рекомендации. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013. – 56 с.