

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ»**

Факультет біотехнології і біотехніки
(повна назва інституту/факультету)

Кафедра промислової біотехнології
(повна назва кафедри)

Дипломний проект

на здобуття ступеня бакалавра

з напрямку підготовки 6.051401 Біотехнологія
(код і назва)

на тему: Технологія виробництва туберкульозної вакцини БЦЖ. Дільниця біосинтезу

Виконав: студент 4 курсу, групи БТ-21
(шифр групи)

Літаш Анна Станіславівна _____
(прізвище, ім'я, по батькові) (підпис)

Керівник доц., к.б.н. Орябінська Лариса Борисівна _____
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали) (підпис)

Консультант Розділ 5 доц., к.т.н. Ружинська Л.І. _____
(назва розділу) (посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище, ініціали) (підпис)

Рецензент доц., к.т.н. Щурська К.О. _____
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали) (підпис)

Київ – 2016 року

Актуальність проекту

Ситуація щодо туберкульозу в Україні досить складна. Туберкульоз не є тільки медичною проблемою. Це - проблема соціальна, яка віддзеркалює соціально-економічний стан країни, культурно-освітній рівень та благополуччя населення, ступінь розвитку охорони здоров'я, у тому числі і фтизіатричної служби.

Найкращим способом вакцинації проти туберкульозу вважається внутрішньошкірна ін'єкція вакцини БЦЖ, яка вимагає дотримання правильної техніки введення, відповідної дози препарату для отримання достатнього рівня імунологічної активності при мінімальній кількості поствакцинальних ускладнень.

Тому на даний час є дуже актуальним питання створення вискоєфективної інактивованої вакцини проти туберкульозу за рахунок підбору високоімуногенних штамів з урахуванням їх культуральних, антигенних та молекулярно-біологічних особливостей, оптимізації складу поживних середовищ та режимів культивування бактерій БЦЖ для забезпечення максимального накопичення біомаси, придатної для створення інактивованої вакцини.

Мета

Метою дипломного проекту є розробка оптимального технологічного процесу для виробництва вакцини БЦЖ в одному із фармацевтичних заводів на території України.

Завдання

1. підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва вакцини;
2. провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів;

3. обґрунтувати схему отримання продукту, що використовується у проєкті;
4. розглянути основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва;
5. скласти матеріальний баланс виробництва;
6. обрати технологічну і апаратурну схему;
7. обґрунтувати вибір конструкції апарату;
8. здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

БЦЖ (*Бацила Кальметта - Герена* або *Bacillus Calmette-Guérin, BCG*) - вакцина проти туберкульозу, виготовлена зі штаму ослабленої живої коров'ячої туберкульозної палички (лат. *Mycobacterium bovis BCG*), яка практично втратила вірулентність для людини, будучи спеціально вирощеною на штучному середовищі.

Збудники туберкульозу характеризуються вираженим поліморфізмом. Вони мають форму довгих тонких (*Mycobacterium tuberculosis*) або коротких товстих (*Mycobacterium bovis*), прямих або злегка вигнутих паличок, нерухомі, спор не утворюють, мають мікрокапсулу (поверхневий шар мікозидів). Клітинна стінка мікобактерій має складну будову. Первинний каркас клітинної стінки, утворений пептидогліканом, як у грампозитивних бактерій, дублює шар арабіногалактану. Зовнішні шари клітинної стінки представлені ліпідами.

Збудники туберкульозу при посіві патологічного матеріалу ростуть повільно. Колонії мікобактерій туберкульозу бичачого виду з'являються тільки через 20-60 днів, а пташиного через 15-30 днів після посіву. При

адаптації до поживного середовища швидкість росту може зростати. Оптимальна температура росту 37-38 ° С, *Mycobacterium avium* може рости при 45 ° С.

Для виділення збудників туберкульозу застосовують складні тверді поживні середовища (Левенштейна-Йенсена, Гельберга, Петраньяні, ФАСТ-3л, ВКГ і ін.). Після адаптації можуть рости на рідких і щільних поживних середовищах простого складу (гліцерин- картопля), з використанням в якості джерела азоту аспарагіна (середовище Сотона) або щавлевокислого амонію (середовище Моделя).

Mycobacterium bovis і *Mycobacterium tuberculosis* мають на 90-95% антигенну спорідненість, в свою чергу з *Mycobacterium avium* у зазначених видів вона не перевищує 70-80% і їх можна чітко диференціювати антигенним складом в серологічних тестах.

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

Вакцина БЦЖ представлена штамом туберкульозних мікобактерій бичого типу з ослабленою вірулентністю.

Особливість протитуберкульозної вакцини (БЦЖ) - формування клітинного імунітету. Реалізація клітинного протівірусного захисту відбувається шляхом активації макрофагів і цитотоксичних Т-лімфоцитів. Макрофаги отримують активаційний сигнал від ІФ-γ, синтезованого Th1-лімфоцитами при дії на них ІЛ-12. Цей цитокін продукує антигенпрезентуючі клітини, які захопили вакцинальний антиген.

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

Mycobacterium bovis є збудником туберкульозу в ряді видів тварин і людини, у світі щорічні втрати в сільському господарстві становлять 3 млрд доларів. Наслідки туберкульозу у людини, що викликала *Mycobacterium bovis*

досі в значній мірі невідомі. *Mycobacterium bovis* є основним продуцентом для *Mycobacterium bovis* BCG, що являється основою вакцини БЦЖ. На малюнку зображено 4345492 пар основ послідовностей генома *Mycobacterium bovis* AF2122 / 97. Вражаюче те що, послідовність генома *Mycobacterium bovis* є на 99,95% ідентична *Mycobacterium tuberculosis*, але видалення генетичної інформації призвело до зменшення розміру генома.

Аттенуйований штам за заміненою віруленстістю отримують культивуванням на несприятливих середовищах.

Культивуються *Mycobacterium bovis* в аеробних умовах на живильних середовищах: Петран'яні, Гельберга, Левенштейна-Ієнсена, Фінн-2, ФАСТ - 3Л, Павловського та інші. Найкращим середовищем являється картопляне з бичачою жовчу і гліцерином. Саме безперервна несприятлива дія жовчі призводить до ослаблення вірулентної дії жовчі. На даний момент зазначено, що для зміни потрібно приблизно десять пасажів по п'ять недінь на кожну. На живильних середовищах *Mycobacterium bovis* ростуть дуже повільно у вигляді гладеньких (S-форма) та шорстких крихкуватих (R-форма) матових колоній або скупчень, а також у вигляді зморшкуватого нальоту білого, кремо-вого, або біло-жовтого кольору (суцільний ріст).

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

Кінцева продукція виробництва являє собою живу, ліофілізовану вакцину, виведену зі штамів *Mycobacterium bovis* (паличка Кальметта-Герена), що використовується для профілактики туберкульозу.

Термін придатності – 18 місяців від дати виготовлення, при умові дотримання вищенаведених вимог.

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

Отримання бактеріальної маси в промисловості проводять в ферментері. Ферментер являє собою циліндричний апарат, що складається з корпусу, привареного до нього еліптичного днища та кришки. Виробництво мікробіологічного синтезу проводять в стерильних умовах ведення процесу культивування.

При культивуванні мікроорганізму потрібно використовувати такі насоси, щоб, з одного боку, не допускали контамінацію (забезпечують стерильність процесу), а з іншого боку унеможливили викиди речовини з культурою у навколишнє середовище. Для цих цілей був обраний центробіжний герметичний електронасос типу ХГВ (ГОСТ 20791-75Е) та ЦНГ.

Як видно з технологічної частини проекту виробництва живої вакцини БЦЖ використовуються рухомі механічні пристрої, які приводяться в рух за допомогою електричної енергії, а також відбуваються процеси, що супроводжуються значним виділенням теплової енергії. Даний проект передбачає використання внутрішньоцехового транспорту – трубопроводів, ручних візків, тари проміжного продукту. На стадії біосинтезу використовуються речовини та мікроорганізми, небезпечні для здоров'я людини, пожежовибухонебезпечні речовини та матеріали.

Проект виконується з урахуванням вимог охорони праці, пожежобезпеки та екологічної безпеки.

ВИСНОВКИ

В дипломній роботі розроблено технологію виробництва туберкульозної вакцини БЦЖ.

1. В якості продуцента обрано штам *Mycobacterium bovis*, який отриманий в результаті відбору клону з найкращою імуногенністю.

2. Розроблені технологічна та апаратурна схеми лінії виробництва живої вакцини включаючи параметри контролю, виконання яких забезпечує належну якість продукції та безпеку персоналу.
3. Для виробничого культивування було підбрано та розраховано ферментер об'ємом $0,025\text{м}^3$, який забезпечує оптимальні умови росту бактеріальної культури. Технологічний, конструктивний та гідравлічний розрахунки апарату підтверджують надійність обраної конструкції.
4. Проект виконано з урахуванням вимог охорони праці, пожежної та екологічної безпеки, проаналізовано шкідливі та небезпечні фактори виробництва та запропоновано методи їх попередження та уникнення в умовах виробництва.