Probl Cryobiol Cryomed 2022; 32(1):063–067
https://doi.org/10.15407/cryo32.01.063

УДК 619:616.98:579.873.21

А.І. Завгородній[1]*, В.В. Білушко[1], А.П. Палій[1],
М.В. Калашник[1], Н.В. Калашник[1], А.П. Палій[2]

Підвищення стабільності туберкуліну очищеного (PPD) для ссавців шляхом ліофілізації

UDC 619:616.98:579.873.21

A.I. Zavhorodnii [1]*, V.V. Bilushko [1], A.P. Paliy [1],
M.V. Kalashnyk [1], N.V. Kalashnyk [1], A.P. Paliy [2]

Freeze-Drying Improved the Stability of Tuberculin Purified Protein Derivative (PPD) in Mammals

Ключові слова: туберкулін, ліофілізація, біологічна активність, реактогенність, сенсибілізувальні властивості.
Key words: tuberculin, freeze-drying, biological activity, reactogenicity, sensitizing properties.

Туберкульоз є одним із найнебезпечніших зооантропонозних захворювань у світі, яке розповсюджене серед людей, а також сільськогосподарських і диких тварин [4, 6]. Окрім загрози здоров'ю людей, це захворювання також призводить до значних економічних збитків у галузі тваринництва (витрати на проведення додаткових діагностичних і спеціальних ветеринарно-санітарних заходів, недоотримання продукції тощо) [8, 9].

Мікобактеріальні алергени, зокрема туберкуліни, які використовують для прижиттєвої діагностики туберкульозу тварин і птиці, мають відповідати певним вимогам, основними з яких є специфічність і стабільність. Недостатня діагностична ефективність цих препаратів може призвести до поширення туберкульозної інфекції, яку не вдалося виявити на ранніх стадіях захворювання [2, 3]. Якість мікобактеріальних алергенів має велике значення для прижиттєвого виявлення туберкульозу у тварин [7]. Так, за низької активності та специфічності препаратів у гуртах можуть залишатися хворі на туберкульоз тварини, що призведе до значного поширення цієї інфекції. За умов гіперактивності й недостатньої специфічності алергенів можуть спостерігатися хибнопозитивні реакції у здорових продуктивних тварин [5]. Відомо, що одним із перспективних методів отримання якісних і стабільних біопрепаратів, а також консервування та

Tuberculosis is one of the most dangerous zoonotic diseases worldwide, which is common among humans, as well as farm and wild animals [3, 5]. In addition to endangering human health, this disease also leads to significant economic losses in the livestock sector (costs of additional diagnostic and special veterinary measures, product shortages, *etc.*) [7, 9].

Mycobacterial allergens, in particular tuberculins, which are used for a lifelong diagnosis of tuberculosis in animals and poultry, must meet certain requirements, the main of which are specificity and stability. Insufficient diagnostic efficacy of these drugs can result in the spread of tuberculosis infection, which could not be detected at the early stages of the disease [1, 2]. The quality of mycobacterial allergens is of great importance for the lifelong detection of tuberculosis in animals [6]. Thus, with low activity and specificity of drugs the patients with tuberculosis may remain in groups, that will lead to a serious spread of this infection. Under conditions of hyperactivity and insufficient specificity of allergens, false-positive responses can be observed in healthy productive animals [5]. One of the promising ways of obtaining the high-quality and stable biological products, as well as preservation and long-term storage of microorganisms, is known to be freeze-drying of pre-frozen material in vacuum [10]. Therefore, the production of tuberculins as a lyophilisate must in-

[1] Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків
[2] Державний біотехнологічний університет, м. Харків

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**
вул. Пушкінська, 83, м. Харків, Україна 61023;
тел.: (+38 095) 059-82-25
електронна пошта: bw.pochta@gmail.com

Надійшла 05.05.2021
Прийнята до друку 14.12.2021

[1] National Scientific Center 'Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine', Kharkiv
[2] State Biotechnology University, Kharkiv

***To whom correspondence should be addressed:**
83, Pushkinska str., Kharkiv, Ukraine 61023;
tel.:+380 95 059 8225
e-mail: bw.pochta@gmail.com

Received 05, May, 2021
Accepted 14, December, 2021

© 2022 A.I. Zavhorodnii, *et al*. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

тривалого зберігання мікроорганізмів, є сублімаційна сушка попередньо замороженого матеріалу у вакуумі [10]. Тому і виготовлення туберкулінів у формі ліофілізату має підвищити стабільність основних властивостей цих препаратів упродовж значно більшого терміну зберігання, що доцільно використовувати зокрема під час виготовлення стандартних серій.

Мета даної роботи – дослідження впливу ліофілізації туберкуліну очищеного для ссавців на стабільність його основних властивостей.

Вивчення стабільності основних показників якості туберкуліну сухого очищеного (PPD) для ссавців (№ 1) проводили у порівнянні з комерційною серією PPD для ссавців у стандартному розчині (№ 39), виготовленому Державним підприємством «Сумська біофабрика» (Україна) 18.07.2017 р. після трьох років зберігання за температури від 2 до 8°С.

Дослідження проведені за фізико-хімічними (масова частка білка) та біологічними (активність, видова специфічність, реактогенність, відсутність сенсибілізувальних властивостей) показниками. Біологічну активність, специфічність, реактогенність і відсутність сенсибілізувальних властивостей дослідних зразків різних серій PPD для ссавців вивчали в дослідах на клінічно здорових морських свинках (*Cavia porcellus*) живою масою не менше 350,0 г. Для визначення біологічної активності зразків 15 лабораторних тварин попередньо (за 30 діб до початку досліду) сенсибілізували підшкірно зависсю живої культури мікобактерій вакцинного штаму BCG у дозі 1,0 мг бактеріальної маси в 1,0 см^3 стерильного ізотонічного розчину (гомологічна біосистема). Для вивчення специфічності туберкулінів 10 морських свинок (за 30 діб до початку досліду) сенсибілізували підшкірно зависсю суміші (у рівних частинах) живих культур атипових мікобактерій видів *Mycobacterium intracellulare* (штам № 78/98) і *Mycobacterium scrofulaceum* (штам № 31/82) в дозі 1,0 мг бактеріальної маси в 1,0 см^3 стерильного ізотонічного розчину (гетерологічна біосистема). Усі експерименти були дозволені комісією з біоетики ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (Україна).

Для удосконалення технологічного регламенту отримання сухого PPD для ссавців відпрацьовано температурний режим ліофілізації та виготовлено дослідну серію цього препарату (№ 1).

Для виготовлення дослідної серії туберкуліну матричну культуру (виробничий штам *Mycobacterium bovis* ІЕКВМ-1) висівали у 15 бутлів (ємністю 3,0 л з вмістом по 1,0 л середовища) на рідке синтетичcrease the stability of the basic properties of these drugs during a much longer shelf life, which should be used, in particular, in manufacturing the standard series.

The aim of this research was to study in mammals the effect of freeze-drying of tuberculin purified protein derivative on the stability of its basic properties.

The main quality parameters of dry tuberculin purified protein derivative (PPD) for mammals (№ 1) was investigated in comparison with the commercial series of tuberculin PPD for mammals in standard solution (№ 39), manufactured by the State Enterprise ‘Sumy Biofactory’ (Ukraine) 07/18/2017 after three years of storage at a temperature from 2 to 8°C.

We examined physical, chemical (protein mass fraction) and biological (activity, species specificity, reactogenicity, lack of sensitizing properties) parameters. Biological activity, specificity, reactogenicity and lack of sensitizing properties of test samples of different batches of tuberculin PPD for mammals were studied in experiments in clinically healthy guinea pigs (*Cavia porcellus*) with a live weight of at least 350.0 g. To determine the biological activity 15 laboratory animals previously (30 days before the experiment) were subcutaneously sensitized with a live culture of mycobacteria of the vaccine strain BCG at a dose of 1.0 mg of bacterial mass in 1.0 cm^3 of sterile isotonic solution (homologous biosystem). To study the specificity of tuberculins, 10 guinea pigs (30 days before the experiment start) were subcutaneously sensitized with a mixture (in equal parts) of live cultures of atypical mycobacteria of *Mycobacterium intracellulare* (strain № 78/98) and *Mycobacterium scrofulaceum* (strain № 31/82) at a dose of 1.0 mg of bacterial mass in 1.0 cm^3 of sterile isotonic solution (heterologous biosystem). All the experiments were approved by the Bioethics Commission of the NSC ‘Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine’ (Ukraine).

For improving the technological regulations to produce the dry tuberculin PPD for mammals, the temperature regimen of freeze-drying was developed and there were prepared the experimental series of this drug (№ 1).

To produce the experimental series of tuberculin, a matrix culture (production strain *Mycobacterium bovis* IEKVM-1) was seeded in 15 bottles (3.0 liters with a content of 1.0 liter of medium) with a liquid synthetic nutrient medium with glycol and cultured in a thermostat for 60 days at a temperature of (37.0 ± 0.5)°C. Afterwards, the bottles with the grown bacterial mass

не поживне середовище з глікоколом і культивували у термостаті протягом 60-ти діб за температури (37,0 ± 0,5)°С. Після цього бутлі з вирощеною бактеріальною масою автоклавували при 132°С протягом 60 хв, бактеріальну масу відокремлювали від культуральної рідини шляхом фільтрації через стерильні ватно-марлеві фільтри. Отриманий культуральний фільтрат очищали від залишків бактеріальної маси шляхом центрифугування при 1,957g упродовж 20 хв і концентрували. У напівфабрикаті туберкуліну визначали вміст загального білка за методом К'єльдаля [1], після чого додавали сахарозу у кількості 5,0%. Виготовлений алерген стерилізували шляхом фільтрації та розливали у стерильні скляні флакони (ємністю 10 см^3) у кількості по 5,0 см^3, закривали гумовими пробками та проводили пристінне заморожування в апараті «Н3-12:50» (Frigera, Чехія) з етиловим спиртом (охолодженим до температури –30…–40°С протягом 15–20 хв), після чого витримували у холодильній камері впродовж 12-ти годин за температури –50°С і ліофілізували на установці типу «LZ-45.27» (Frigera, Чехія).

Після двогодинної попередньої витримки матеріалу температуру субліматора підвищували від –(55,0 ± 1,0) до (5,0 ± 0,5)°С і потім витримували ще 2 години. Далі температуру підвищували до (20,0 ± 1,0)°С та витримували впродовж 8,5 годин. Наступним етапом (через 8,5 годин) температуру підвищували до (40,0 ± 1,0)°С та витримували також впродовж 8,5 годин. Після цього температуру підвищували до (55,0 ± 1,0)°С та витримували 21 годину. Режим ліофілізації відпрацьовували до отримання характерного зовнішнього вигляду сухого туберкуліну у формі пігулки.

Після отримання сухого препарату (фармацевтична форма – ліофілізат) визначали його якість за такими фізико-хімічними та біологічними показниками, як зовнішній вигляд, стерильність (ДСТУ 4483:2005), розчинність (візуально), вміст загального білка (%). На морських свинках визначали біологічну активність, специфічність, реактогенність, відсутність сенсибілізувальних властивостей препарату.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили із застосуванням програми «Statistica 10.0» (StatSoft, США). Отримані в результаті експерименту числові дані обробляли методом варіаційної статистики за допомогою непараметричних і параметричних критеріїв. Різницю між двома величинами вважали значущою на рівні p < 0,05.За контроль брали комерційну серію PPD для ссавців у стандартному розчині (№ 39), виготовлену Державним підприємством «Сумська біофабрика» 18.07.2017 р. (таблиця).

were autoclaved at 132°C for 60 min, the bacterial mass was separated from the culture fluid by filtration through sterile cotton gauze filters. The resulting culture filtrate was purified from residual bacterial mass by centrifugation at 1,957 g for 20 min and concentrated. The content of total protein in the semi-finished tuberculin was determined by the Kjeldahl method [8], and then sucrose was added in the amount of 5.0%. The prepared allergen was sterilized by filtration and poured into 10 cm^3 sterile glass vials in the amount of 5.0 cm^3, then the vials were plugged with rubber stoppers and frozen near walls with the device 'H3-12: 50' (Frigera, Czech Republic) with ethyl alcohol (chilled) to a temperature of –30…–40°C for 15–20 mins), then kept in a refrigerator for 12 hours at a temperature of –50°C and frozen-dried by means of a LZ-45.27 (Frigera, Czech Republic).

After two hours of pre-exposure of the material, the temperature in a freeze-drier was raised from (55.0 ± 1.0)°C to (5.0 ± 0.5)°C and then it kept for another 2 hours. Later the temperature was raised to (20.0 ± 1.0)°C and kept for 8.5 hours. In the next step (after 8.5 hours) the temperature was raised to (40.0 ± 1.0)°C and also maintained for 8.5 hours. Afterwards the temperature was enhanced to (55.0 ± 1.0)°C and kept for 21 hours. The freeze-drying regimen was mastered to obtain the characteristic appearance of dry tuberculin in a pill form.

After obtaining the dry product (lyophilisate as a pharmaceutical form), its quality was examined by physicochemical and biological indices, such as appearance, sterility (State Technical Standards of Ukraine 4483:2005), solubility (visually), total protein content (%). In guinea pigs we determined biological activity, specificity, reactogenicity, lack of sensitizing properties of the drug.

The research results were statistically processed using the 'Statistica 10.0' (StatSoft, USA) software. The findings are statistically significant at $p < 0.05$. The numerical data obtained as a result of the experiment were processed by the variation statistics using non-parametric and parametric criteria. Commercial series of tuberculin PPD for mammals in standard solution (№ 39), manufactured by the State Enterprise 'Sumy Biofactory' on 07/18/2017 (Table) was assumed as a control.

The investigation of the stability of dry tuberculin PPD showed a significant reduction in the protein mass fraction by 28.57% ($p < 0.05$) in the series of tuberculin (PPD) for mammals in standard solution (№ 39) after three years of storage compared to this value during the tuberculin manufacturing. It should be noted that the mass fraction of

За результатами вивчення стабільності сухого PPD встановлено значуще зниження вмісту масової частки білка на 28,57 % ($p < 0,05$) в серії PPD для ссавців у стандартному розчині (№ 39) через три роки зберігання порівняно з цим показником під час виготовлення туберкуліну. Слід зазначити, що масова частка білка в серії ліофілізованого PPD (№ 1) для ссавців значуще не змінювалася протягом трьох років зберігання. Під час зберігання впродовж цього терміну туберкуліну у ліофілізованому вигляді краще зберігалися біологічна активність препарату ((55678 ± 4873) і (54369 ± 5120) МО відповідно) та вміст загального білка ((0,83 ± 0,14) і (0,81 ± 0,13) мг/см^3 відповідно), тобто ці показники суттєво не змінюються протягом зберігання. При цьому у контрольному зразку стандартного розчину туберкуліну для ссавців під час зберігання протягом трьох років спостерігається зниження як кількості загального білка ((0,98 ± 0,11) і (0,70 ± 0,10) мг/см^3), так і біологічної активності препарату ((52733 ± 4672) і (48782 ± 4221) МО відповідно).

Результати досліджень свідчать про те, що сухий PPD для ссавців після зберігання впродовж трьох років не змінює своїх властивостей, є активним, специфічним, нереактогенним, не викликає сенсибілізації тварин. Ліофілізований PPD для ссавців краще зберігає свої діагностичні властивості.

protein in the series of frozen-dried PPD (№ 1) for mammals did not change significantly during three years of storage. During storage within this period of tuberculin in a frozen-dried form the were better preserved a biological activity of the drug ((55,678 ± 4,873) and (54,369 ± 5,120) IU, respectively) and total protein content ((0.83 ± 0.14) and (0.81 ± 0.13) mg / cm^3, respectively), *i. e.* these indices did not change notably during storage. In the control sample of standard solution of tuberculin for mammals during storage for three years there was a decrease in the amount of total protein (0.98 ± 0.11 and 0.70 ± 0.10 mg / cm^3) and biological activity of the drug ((52,733 ± 4,672) and (48,782 ± 4,221) IU, respectively).

The results of studies indicate that dry tuberculin PPD for mammals after storage for three years at a temperature of 2–8°C is active, specific, non-reactogenic and does not cause sensitization of animals. Frozem-dried tuberculin PPD for mammals better retains its diagnostic properties.

Thus, the tuberculin in the form of lyophilisate was found to be more stable drug compared to a similar one made as a standard solution.

Результати вивчення стабільності туберкуліну сухого очищеного для ссавців
Research results on stability of tuberculin purified protein derivative for mammals

Серія туберкуліну Tuberculin series	Термін зберігання Shelf-life	Масова частка білка, мг/см^3 Protein mass fraction, mg / cm^3	Біологічні показники Biological indices				Стерильність Sterility
			Біологічна активність, МО Biological activity, IU	Специфічність Specificity	Реактогенність Reactogenicity	Відсутність сенсибілізувальних властивостей Lack of sensitizing properties	
Туберкулін очищений для ссавців ліофілізований (№ 1) Frozen-dried tuberculin purified protein derivative for mammals (№ 1)	Під час виготовлення During manufacturing	0,83 ± 0,14	55678 ± 4873	Специфічний Specific	Нереактогенний Non-reactogenic	Сенсибілізувальні властивості відсутні No sensitizing properties	Стерильний Sterile
	Через 3 роки In 3 years	0,81 ± 0,13	54369 ± 5120				
Туберкулін очищений для ссавців у стандартному розчині (№ 39) (контроль) Tuberculin purified protein derivative for mammals in standard solution (№ 39) (control)	Під час виготовлення During manufacturing	0,98 ± 0,11	52733 ± 4672				
	Через 3 роки In 3 years	0,70 ± 0,10 *	48782 ± 4221				

Примітка: * — відмінності значущі до туберкуліну очищеного для ссавців ліофілізованого зразка №1, $p < 0,05$.
Note: *– differences are significant for frozen-dried tuberculin purified protein derivative for mammals №1, $p < 0.05$.

довж трьох років за температури 2–8°С є активним, специфічним, нереактогенним і не зумовлює сенсибілізації тварин. При цьому PPD для ссавців у ліофілізованому стані краще зберігає діагностичні властивості.

Таким чином встановлено, що туберкулін у формі ліофілізату є стабільнішим препаратом порівняно з аналогічним препаратом, виготовленим у формі стандартного розчину.

Результати досліджень будуть використані для ліофілізації стандартного зразка туберкуліну очищеного для ссавців на Державному підприємстві «Сумська біофабрика».

Література

1. Мазор Л. Методы органического анализа. Москва: Мир; 1986. 584 с.
2. Álvarez J, Perez A, Bezos J, *et al.* Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. Vet Microbiol. 2012; 155 (1): 38–43.
3. Basybekov SZ, Bazarbayev MB, Yespembetov BA, *et al.* Diagnostics of tuberculosis and differentiation of nonspecific tuberculin reactions in animals. Braz J Microbiol. 2018; 49 (2): 329–35.
4. Buddle BM, de Lisle GW, Griffin JFT, *et al.* Epidemiology, diagnostics, and management of tuberculosis in domestic cattle and deer in New Zealand in the face of a wildlife reservoir. N Z Vet J. 2015; 63 (sup1): 19–27.
5. Buddle BM, McCarthy AR, Ryan TJ, *et al.* Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. Vet Rec. 2003; 153 (20): 615–20.
6. De Garine-Wichatitsky M, Caron A, Kock R, *et al.* A review of bovine tuberculosis at the wildlife–livestock–human interface in sub-Saharan Africa. Epidemiol Infect. 2013; 141 (7): 1342–56.
7. Hartnack S, Torgerson PR. The accuracy of the single intradermal comparative skin test for the diagnosis of bovine tuberculosis – estimated from a systematic literature search. J Mycobac Dis [Internet]. 2012 Aug 24 [cited 2021 Mar 10]; 2(6):1000120. Available from: https://www.longdom.org/open-access/the-accuracy-of-the-single-intradermal-comparative-skin-test-for-the-diagnosis-of-bovine-tuberculosis-estimated-from-a-systematic-literature-search-2161-1068.1000120.pdf
8. Mathews F, Macdonald DW, Taylor GM, *et al.* Bovine tuberculosis (Mycobacterium bovis) in British farmland wildlife: the importance to agriculture. Proc Biol Sci. 2006; 273 (1584): 357–65.
9. Schiller I, Oesch B, Vordermeier HM, *et al.* Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. Transbound Emerg Dis. 2010; 57 (4): 205–20.
10. Ukhovskyi VV, Paliy AP, Tarasov OA, *et al.* Using of glycerol and DMSO for Leptospira interrogans cryopreservation. Probl Cryobiol Cryomed. 2019; 29 (1): 102–6.

The obtained research results will be used for freeze-drying the standard sample of tuberculin purified protein derivative for mammals at the State Enterprise 'Sumy Biofactory'.

References

1. Álvarez J, Perez A, Bezos J, et al. Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. Vet Microbiol. 2012; 155 (1): 38–43.
2. Basybekov SZ, Bazarbayev MB, Yespembetov BA, *et al.* Diagnostics of tuberculosis and differentiation of nonspecific tuberculin reactions in animals. Braz J Microbiol. 2018; 49 (2): 329–35.
3. Buddle BM, de Lisle GW, Griffin JFT, *et al.* Epidemiology, diagnostics, and management of tuberculosis in domestic cattle and deer in New Zealand in the face of a wildlife reservoir. N Z Vet J. 2015; 63 (sup1): 19–27.
4. Buddle BM, McCarthy AR, Ryan TJ, *et al.* Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. Vet Rec. 2003; 153 (20): 615–20.
5. De Garine-Wichatitsky M, Caron A, Kock R, *et al.* A review of bovine tuberculosis at the wildlife–livestock–human interface in sub-Saharan Africa. Epidemiol Infect. 2013; 141 (7): 1342–56.
6. Hartnack S, Torgerson PR. The accuracy of the single intradermal comparative skin test for the diagnosis of bovine tuberculosis – estimated from a systematic literature search. J Mycobac Dis [Internet]. 2012 Aug 24 [cited 2021 Mar 10]; 2(6):1000120. Available from: https://www.longdom.org/open-access/the-accuracy-of-the-single-intradermal-comparative-skin-test-for-the-diagnosis-of-bovine-tuberculosis-estimated-from-a-systematic-literature-search-2161-1068.1000120.pdf
7. Mathews F, Macdonald DW, Taylor GM, *et al.* Bovine tuberculosis (Mycobacterium bovis) in British farmland wildlife: the importance to agriculture. Proc Biol Sci. 2006; 273 (1584): 357–65.
8. Mazor L. [Organic analysis methods]. Moscow: Mir; 1986. 584 p. Russian.
9. Schiller I, Oesch B, Vordermeier HM, *et al.* Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. Transbound Emerg Dis. 2010; 57 (4): 205–20.
10. Ukhovskyi VV, Paliy AP, Tarasov OA, *et al.* Using of glycerol and DMSO for Leptospira interrogans cryopreservation. Probl Cryobiol Cryomed. 2019; 29 (1): 102–6.