

Кошкидько Александра Геннадьевна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ЭРИТРОЦИТАРНЫХ
ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУЛЯРЕМИИ И ИНДИКАЦИИ ЕЁ
ВОЗБУДИТЕЛЯ**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном казённом учреждении здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора).

Научный руководитель:

Жарникова Ирина Викторовна, доктор биологических наук, Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, научно-производственная лаборатория препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Уткин Денис Валерьевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра микробиологии и физиологии растений биологического факультета, профессор кафедры, г. Саратов;

Павлович Наталья Владимировна, доктор медицинских наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, отдел природно-очаговых и зоонозных инфекций, и.о. заведующая отделом, г. Ростов-на-Дону.

Ведущая организация:

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Иркутск.

Защита состоится «__»_____2023 г. в «__» часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ.

Автореферат разослан «__»_____ 2023 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 64.1.002.01
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Лабораторная диагностика туляремии имеет важнейшее значение в комплексе противоэпидемических мероприятий и складывается из индикации, идентификации возбудителя или его специфических антигенов и определения сывороточных антител у человека и восприимчивых животных.

Стремительное развитие биотехнологии в последние годы привело к появлению новых методов исследования (Арнаудова К.Ш. с соавт., 2022; Литвинов О.Б. с соавт., 2022; Никифоров К.А., 2022; Sharma N. et al, 2013; Chaignat V. et al, 2014), однако огромное значение в лабораторной диагностике имеет хорошо известная реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) (Микаилов М.М. с соавт., 2022; Рубис Л.В., 2022). Актуальным остается как разработка эритроцитарных диагностикумов, за счет доступности сырья, простоты производства и применения, так и усовершенствование существующих технологий с учетом их стабильности, безопасности, эффективности и качества.

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора выпускает эритроцитарные препараты: набор реагентов Диагностикум эритроцитарный туляремиальный антигенный жидкий («РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ») и набор реагентов Диагностикум эритроцитарный туляремиальный иммуноглобулиновый жидкий («РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ») со сроком годности 1 год. Такие препараты требуют определенного температурного режима хранения и транспортирования, находящегося в пределах (5 ± 3) °С, нарушение которого приводит к полной потере их биологической активности.

В связи с этим возникает необходимость в разработке условий стабилизации эритроцитарных препаратов. В данном аспекте одним из решений проблемы является разработка лиофилизированных форм, так как в сухих препаратах резко замедляются или вовсе прекращаются биохимические процессы, в результате чего они становятся более устойчивыми к факторам внешнего воздействия и сохраняют первоначальные свойства в течение длительного периода хранения. Отсутствие унифицированной технологии лиофильного высушивания биологических объектов обуславливает необходимость проведения исследований по стабилизации каждого конкретного препарата. Одним из специальных приемов, способных защитить препараты при замораживании и лиофилизации, является применение сред высушивания различного состава, обеспечивающих мелкопористую плотную структуру конечного продукта и сохранение нативных свойств.

При разработке, производстве и использовании диагностических наборов реагентов необходимо устанавливать, документировать и поддерживать в рабочем состоянии

непрерывный процесс идентификации опасностей, определяя, оценивая, управляя сопутствующими рисками и проводя мониторинг результативности такого управления.

Процесс менеджмента риска должен осуществляться производителями на протяжении всего производственного цикла медицинских изделий для диагностики *in vitro* – от формулирования входных данных до постпроизводственного наблюдения за выпускаемыми медицинскими изделиями. На этапе формулирования входных данных проведение менеджмента риска позволяет выявить потенциальные опасности, связанные с применением медицинского изделия (Бурова Е.Д. с соавт., 2017).

Таким образом, необходимо усовершенствовать технологию получения стабильных препаратов и методов диагностики, направленных на сокращение времени проведения анализа, его упрощение при одновременном увеличении надёжности, лёгкости интерпретации полученных результатов при высокой чувствительности, специфичности, позволяющих в короткие сроки определить причину эпидемических осложнений и провести противоэпидемические мероприятия (Старцева О.Л. с соавт., 2019). А применение процесса менеджмента риска при производстве, контроле, хранении, транспортировании, использовании и утилизации препаратов будет способствовать уменьшению или устранению рисков в технологических процессах.

Цель работы: совершенствование технологии производства эритроцитарных препаратов для диагностики туляремии и индикации её возбудителя путем лиофильного высушивания и внедрение приёмов менеджмента рисков.

Задачи исследования:

1. Разработать эффективный комплекс среды высушивания, предохраняющий эритроцитарные препараты от разрушения при замораживании и лиофилизации.
2. Подобрать режим и схему лиофилизации эритроцитарных диагностикумов и 50 % формализированных эритроцитов барана.
3. Провести контроль лиофилизированных эритроцитарных препаратов по физико-химическим и иммунобиологическим показателям.
4. Сконструировать экспериментально-производственные серии лиофилизированных наборов реагентов диагностических эритроцитарных туляремиальных и определить стабильность в процессе хранения.
5. Оценить эффективность применения разработанных лиофилизированных диагностических наборов реагентов на клиническом и полевом материале.
6. Внедрить методические приемы проведения менеджмента рисков при производстве и применении наборов реагентов диагностикумов эритроцитарных туляремиальных сухих.

Разработать технические и эксплуатационные нормативные документы (регламент, технические условия, маркировка, инструкция по применению).

Научная новизна работы. Научно обоснована и экспериментально доказана принципиальная возможность стабилизации эритроцитарных препаратов за счет разработки комплексных сред высушивания (сахароза, желатин, тиомочевина, азид натрия, твин 80), позволяющих предохранять их при замораживании и лиофилизации.

Впервые разработаны и скомпонованы лиофилизированные формы диагностических эритроцитарных туляремийных наборов, обеспечивающие сохранение физико-химических (потеря в массе при высушивании, растворимость, внешний вид), иммунобиологических свойств (аналитическая чувствительность и специфичность), увеличение срока годности, а также осуществление постановки реакции без применения специальной разводящей жидкости.

Впервые внедрены методические приёмы по менеджменту рисков (идентификация рисков в технологических процессах, разработка «Матрицы последствий и вероятностей», проведение корректирующих действий) при конструировании, производстве и применении наборов реагентов диагностикумов эритроцитарных туляремийных сухих, что способствовало повышению качества препаратов.

Приоритетность выполненных исследований подтверждена 3 патентами РФ на изобретения: «Универсальная среда высушивания для стабилизации эритроцитарных диагностикумов туляремийных» (№ 2708636 от 10.12.2019); «Способ приготовления эритроцитарного диагностикума иммуноглобулинового туляремийного» (№ 2747420 от 04.05.2021) и «Способ лиофилизации эритроцитарных диагностикумов туляремийных» (№ 2749355 от 09.06.2021).

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая и практическая значимость исследования состоит в разработке научно обоснованной методики усовершенствования технологии производства эритроцитарных препаратов с последующим конструированием наборов реагентов для экспресс-диагностики туляремии и индикации ее возбудителя, которая учитывает особенности формализированных эритроцитов барана, сенсibilизированных лигандами; свойства сред высушивания; режимы лиофилизации.

Применение разработанных композиций сред высушивания и (13 ± 1) ч режима лиофилизации (вакуум 0,15-0,25 мбар (15-25 Па), температура конденсатора – минус 80-90 °С и плавный подвод тепла до 30 °С) диагностикумов эритроцитарных и 50 % формализированных эритроцитов барана, дающих возможность сохранять их исходные свойства длительное время и транспортировать при различных температурных параметрах

(от минус 37 °С до 37 °С), позволило получить стабильные высокочувствительные, специфичные препараты и проводить постановку РНГА на 0,9 % растворе натрия хлорида.

Применение приёмов по менеджменту рисков при производстве, контроле, хранении, транспортировании, использовании и утилизации наборов реагентов диагностикумов эритроцитарных туляремийных сухих способствовало разработке «Матрицы последствий и вероятностей», дающей информацию об остаточном риске, учтённом при оформлении технической и эксплуатационной документации.

Материалы научных разработок легли в основу двух методических рекомендаций: «Метод управления рисками в системе менеджмента качества», одобренных Ученым советом ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора и утвержденных директором института (протокол № 8 от 10.12.2020) и «Методы определения стабильности основных функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики *in vitro*: долговечность при хранении, стабильность при транспортировании и при использовании», одобренных Ученым советом ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора и утвержденных директором института (протокол № 6 от 01.07.2021) – учрежденческий уровень внедрения.

Проведены межлабораторные, квалификационные испытания и утверждены нормативные документы (НД) (технические условия (ТУ), инструкция по применению, маркировка первичная и вторичная, пусковой регламент (ПУР) на препараты: Набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый сухой» («ДЭТ-Иг») ТУ 21.20.23-056-01897080-2020, ПУР № 01897080-38-20; Набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный сухой» («ДЭТ-Аг») ТУ 21.20.23-055-01897080-2020, ПУР № 01897080-37-20. НД одобрены решением Ученого совета ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора и утверждены директором института (протокол № 8 от 10.12.2020) – учрежденческий уровень внедрения. Подготовлен пакет документов для регистрации в Федеральную службу по надзору в сфере здравоохранения (Росздравнадзор).

Материалы диссертации используются в лекциях и практических занятиях по серологической диагностике возбудителя туляремии на курсах дополнительного профессионального образования на базе ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

Методология и методы исследования. Предметом исследования являлись биотехнологические процессы лиофилизации, контроль эритроцитарных препаратов для диагностики туляремии, индикация ее возбудителя и приемы проведения менеджмента рисков. Основные объекты исследования: среды высушивания, режимы и схемы

лиофилизации, аналитическая чувствительность и специфичность, стабильность, диагностическая ценность, контрольные точки технологических процессов.

Теоретическая база работы – исследования российских и зарубежных ученых, материалы нормативной документации по разработке и контролю препаратов для серологической диагностики туляремии, индикации её возбудителя, методы стабилизации путем лиофилизации, определения рисков на производстве диагностических препаратов. При выполнении работы применяли биотехнологические, биохимические, биофизические, физико-химические, иммунобиологические и статистические методы исследования.

Положения, выносимые на защиту:

- 1.** Полученный многокомпонентный состав среды высушивания (сахароза, желатин, тиомочевина, азид натрия, твин 80) предохраняет эритроцитарные препараты от разрушения при замораживании и лиофилизации, сохраняя их нативные свойства, а также позволяет осуществлять постановку РНГА на 0,9 % растворе натрия хлорида, исключив применение специальной разводящей жидкости.
- 2.** Разработка оптимального (13 ± 1) ч режима лиофильного высушивания (вакуум 0,15-0,25 мбар (15-25 Па), температура конденсатора – минус 80-90 °С и плавный подвод тепла до 30 °С) эритроцитарных диагностикумов туляремийных и 50 % формализированных эритроцитов барана позволяет получать стабильные препараты без потери их физико-химических и иммунобиологических показателей с увеличением срока годности в 2 раза (2 года) по сравнению с жидкой формой препаратов и дает возможность транспортировать их при температурах от минус 37 °С до 37 °С.
- 3.** Диагностическая ценность разработанных лиофилизированных форм препаратов подтверждена при исследовании материала из природных очагов туляремии и объектов окружающей среды (вода, экскременты мышевидных грызунов, погадки хищных птиц, органы и смывы с грудной полости павших животных), клинического материала (сыворотки крови людей).
- 4.** Проведение процесса менеджмента рисков с применением разработанной «Матрицы последствий и вероятностей» при производстве, контроле, хранении, транспортировании, использовании, утилизации позволяет минимизировать риски в технологических процессах.

Степень достоверности. О достоверности результатов работы свидетельствует использование лабораторного, полевого, клинического материала и полученных в ходе исследования данных; сертифицированного оборудования (прошедшего квалификацию, поверку); методов исследования, которые характеризуются высокой чувствительностью, объективностью, соответствуют поставленным в работе цели и задачам.

Обработку и статистический анализ данных проводили с использованием языка R

(версия 4.0.2). Анализ связи между качественными результатами осуществляли с помощью критерия τ -b Кендалла. Критическим уровнем статистической значимости различий установлено значение $p < 0,05$.

Апробация результатов исследования. Основные результаты диссертационной работы были представлены на III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 24-25 апреля 2019 г.); научно-практических конференциях молодых ученых ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (Ставрополь, 16 декабря 2019 г. и 15 декабря 2020 г.); VII Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (Сочи, 28-30 октября 2020 г.); Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Горизонты биотехнологии» (Орел, 25 декабря 2020 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию академика И.Н. Блохиной «Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы» (Нижний Новгород, 26-27 апреля 2021 г.); XIII Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (Москва, 24-26 мая 2021 г.); XIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Екатеринбург, 15-17 сентября 2021 г.); VII Национальном Конгрессе бактериологов, посвященном 100-летию со дня образования Государственной санитарной службы России (Санкт-Петербург, 28-30 сентября 2022 г.); научно-практической конференции «Современные проблемы распространения, диагностики, профилактики и терапии инфекционных заболеваний» (Ставрополь, 29-30 ноября 2022 г.).

Личный вклад автора в исследование. Личное участие автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации, осуществлялось на всех этапах работы и выразилось в анализе и обобщении литературных данных, выполнении всего объема микробиологических, физико-химических, иммунобиологических, иммунохимических, биофизических исследований. При непосредственном участии автора проведены лабораторные, межлабораторные и квалификационные испытания сконструированных лиофилизированных наборов реагентов диагностикумов эритроцитарных туляремийных; оформлена нормативная документация на препараты; методические рекомендации по менеджменту рисков и контролю стабильности. Автором лично проведены статистическая

обработка и анализ полученных данных, проанализированы полученные результаты, сформулированы заключение, выводы и практические рекомендации.

Помощь в выполнении диссертационных исследований оказывали сотрудники ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора: к.б.н. Курчева С.А., к.м.н. Русанова Д.В., к.б.н. Жданова Е.В., д.б.н., профессор Василенко Н.Ф., к.б.н. Абзаева Н.В., Семирчева А.А., к.б.н. Старцева О.Л., Гнусарева О.А., к.м.н. Васильева О.В., к.б.н. Волынкина А.С., д.м.н. Зайцев А.А., к.б.н. Гагиева А.Ю., Жиров А.М., Пилипенко М.В. и сотрудник ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет» к.б.н. Ржепаковский И.В.

Связь работы с научными программами. Диссертационные исследования выполнены в научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора в рамках плановой научно-исследовательской работы: «Оптимизация технологических этапов производства, направленная на повышение качества и стабильности эритроцитарных препаратов для диагностики туляремии и индикации её возбудителя» (2019-2021 гг.), регистрационный № АААА-А19-119032590022-8.

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 17 опубликованных работах: в ведущих научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ – 6 статей, в 3 патентах РФ на изобретения, в статьях и материалах Международных, Всероссийских, региональных научно-практических конференций – 8 публикаций, а также в 8 нормативных документах (регламентах производства, технических условиях, инструкциях по применению, маркировках первичных и вторичных упаковок) и 2 методических рекомендациях.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы и приложений. Она изложена на 175 страницах, содержит 24 таблицы, 24 рисунка и 13 приложений. Список литературы включает 160 отечественных и 66 зарубежных литературных источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка компонентов сред высушивания, схем лиофилизации диагностикумов эритроцитарных туляремиальных, 50 % формализированных эритроцитов и контроль их свойств

При составлении композиций сред высушивания использовали различные ингредиенты: поверхностно-активные вещества (ПАВ), которые могут уменьшить денатурацию белков во время замораживания за счет уменьшения границы раздела лёд-вода (Chang B.S. et al., 1996); углеводы, связывающиеся с поверхностью биологического

материала и защищающие препарат от повреждений при высыхании (Crowe J.H. et al., 1990; Carpenter J.F. et al., 1993; Prestrelski S.J. et al., 1993); коллоиды, обладающие защитным действием (Грачева И.В. с соавт., 2016); антиоксиданты, обладающие мощной биологической активностью (Охупкина В.Ю., 2009); антисептики, угнетающие микробный пророст.

При выполнении экспериментальных работ было изготовлено 20 вариантов защитных сред. Целый объем свежеприготовленных сред делили на 2 группы: в первую добавляли твин 80 и азид натрия; во вторую группу – только азид натрия (таблица 1).

Диагностикумы эритроцитарные туляремийные жидкие центрифугировали, образовавшийся осадок ресуспендировали в средах высушивания до образования 10 % взвеси, разливали в ампулы по 1,0 мл.

Было апробировано 2 режима сушки: (20±1) и (13±1) ч. Наиболее эффективным оказался (13±1) ч, который состоял из 4 этапов и заключался в следующем:

1 этап. Замораживание: диагностикумы замораживали при различных температурах и времени, учитывая, что температура продукта должна быть ниже, чем температура полного затвердевания (эвтектическая), так как иначе, в присутствии солей в белковых растворах, может произойти денатурация белка и в то же время нежелательно замораживать препараты при очень низких температурах, так как это увеличит продолжительность процесса сушки. В результате установлены оптимальные параметры: температура минус (40±2) °С и время 16-18 ч.

2 этап. Первичная сушка (сублимация льда): инициируется появлением вакуума в камере при постепенном нагреве замороженного препарата в объёме, достаточном для сублимации льда. В течение этого периода устанавливали правильный баланс между объёмом подающегося тепла и сублимацией воды, чтобы во время сушки не происходило чрезмерного перегрева замороженного материала и возникновения побочных явлений. Кроме того, устанавливали в камере низкое давление 0,15-0,25 мбар (15-25 Па) и как можно более низкую температуру конденсатора – минус 80-90 °С. Данный этап проходил в течение (5,0±1,0) ч.

3 этап. Вторичная сушка (десорбция): проходил при температуре выше нуля и более низком давлении для извлечения связанной влаги. Особенность данного этапа в том, что необходимо добиться определённых значений остаточной влажности лиофилизата, при которых препарат сохраняет стабильность. Данный процесс проходил в течение (4,0±0,5) ч и плавном подводе тепла (нагрев полок).

Таблица 1 – Ингредиентный состав защитных сред

Ингредиенты	Вариант 1/1	Вариант 2/1	Вариант 3/1	Вариант 4/1	Вариант 5/1	Вариант 6/1	Вариант 7/1	Вариант 8/1	Вариант 9/1	Вариант 10/1	Вариант 11/1	Вариант 12/1	Вариант 13/1	Вариант 14/1	Вариант 15/1	Вариант 16/1	Вариант 17/1	Вариант 18/1	Вариант 19/1	Вариант 20/1
	(количество г (мл) на 100 мл объёма)																			
Желатин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	1	1	-	-	-	-	-
Тиомочевина	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	-	-	-	-
Трегалоза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	4	-	-	-	-	4	-	-	-	-
Сахароза	-	-	-	-	-	-	15	15	-	-	-	-	-	10	5	-	3	4	-	-
Декстран	-	6	-	-	-	-	-	-	10	-	-	6	6	-	-	6	-	-	3	-
Поливинилпирролидон	-	-	3	2	1,5	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Лактоза	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Бычий сывороточный альбумин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2	-	-
Натрия хлорид	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,12	0,12	-	0,9
Твин 80	0,06																			
Азид натрия	0,01																			
Ингредиенты	Вариант 1/2	Вариант 2/2	Вариант 3/2	Вариант 4/2	Вариант 5/2	Вариант 6/2	Вариант 7/2	Вариант 8/2	Вариант 9/2	Вариант 10/2	Вариант 11/2	Вариант 12/2	Вариант 13/2	Вариант 14/2	Вариант 15/2	Вариант 16/2	Вариант 17/2	Вариант 18/2	Вариант 19/2	Вариант 20/2
	(количество г (мл) на 100 мл объёма)																			
Желатин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	1	1	-	-	-	-	-
Тиомочевина	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	-	-	-	-
Трегалоза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	4	-	-	-	-	4	-	-	-	-
Сахароза	-	-	-	-	-	-	15	15	-	-	-	-	-	10	5	-	3	4	-	-
Декстран	-	6	-	-	-	-	-	-	10	-	-	6	6	-	-	6	-	-	3	-
Поливинилпирролидон	-	-	3	2	1,5	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Лактоза	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Бычий сывороточный альбумин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2	-	-
Натрия хлорид	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,12	0,12	-	0,9
Азид натрия	0,01																			

4 этап. Окончательная сушка: проходил при постоянной температуре полки 30 °С. Температура продукта должна быть высокой, однако ниже температуры, при которой продукт денатурирует. Оптимальная температура для препаратов составила (27±1) °С. Терминальный период процесса сушки происходил до момента приближения регистрируемых значений к заданным параметрам, которые не менялись в течение 3-4 ч и соответственно были равны следующим показателям: температура конденсатора – минус 80-90 °С, температура полок – 30 °С, вакуум – 0,15-0,25 мбар (15-25 Па), температура продукта – (27±1) °С, время лиофилизации – (13±1) ч (рисунок 1).

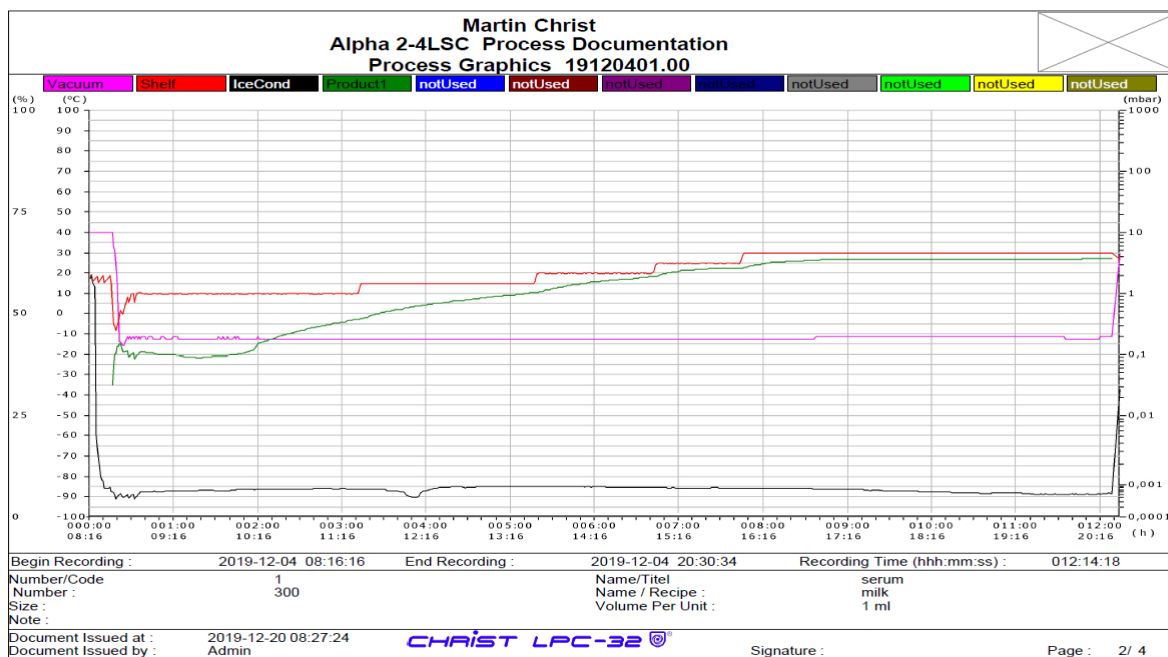


Рисунок 1 – График лиофилизации диагностикумов эритроцитарных туляремийных

После завершения процесса высушивания ампулы с диагностикумом извлекали из камеры и запаивали на газо-кислородной горелке в среде атмосферного воздуха.

Контроль лиофилизаторов проводили в 2 этапа. Первоначально отбраковывали по физико-химическим показателям (наличие конгломератов, плохая растворимость, цветность, высокий показатель потери в массе при высушивании). В результате варианты №№ 3-6, 10-13, 17-20 не соответствовали требованиям, предъявляемым к лиофилизированным препаратам (ОФС.1.4.1.0031.18, ГОСТ Р 51352-2013 и ОФС.1.2.1.0010.15) и в дальнейшем не использовались. Далее контроль проводили по иммунобиологическим показателям в РНГА.

Благодаря подобранной композиции среды высушивания с содержанием твин 80, осуществляли постановку реакции без разводящей жидкости. Для контроля лиофилизированных форм использовали: гомологичные (*F. tularensis*) и гетерологичные штаммы микроорганизмов (*B. abortus*, *Y. enterocolitica*, *S. typhimurium*, *E. coli*), полученные из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора; сыворотки гомологичные (туляремийная

(ФСР 2011/10029) и гетерологичные (бруцеллёзная (ФСР 2012/13323); холерная (ФСР 2007/00468); сальмонеллёзная (РЗН 2017/5914).

Наилучшие результаты были получены со средами высушивания №№ 2/1 и 15/1, чувствительность которых составила: для диагностикума иммуноглобулинового – $7,8 \times 10^5$ м.к./мл (макрометод) и $1,56 \times 10^6$ м.к./мл (микрометод); для диагностикума антигенного – 1:40000 (макрометод) и 1:20000 (микрометод). Диагностикумы специфичны и не дают перекрёстных реакций с гетерологичными пробами (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика диагностикумов эритроцитарных туляреминых сухих 10 % по иммунобиологическим показателям в зависимости от сред высушивания (макрометод)

№ серии	Диагностикум Иг		Диагностикум Аг		Аналитическая специфичность
	РНГА	К ⁻	РНГА	К ⁻	
Диагностикумы жидкие	$7,8 \times 10^5$	+	1:40000	+	отсутствие перекрестных реакций
1/1	$6,25 \times 10^6$	+	1:5000	+	отсутствие перекрестных реакций
2/1	$7,8 \times 10^5$	+	1:40000	+	отсутствие перекрестных реакций
7/1	$6,25 \times 10^6$	+	1:5000	+	отсутствие перекрестных реакций
8/1	$1,25 \times 10^7$	+	1:10000	+	отсутствие перекрестных реакций
9/1	$1,25 \times 10^7$	+	1:10000	+	отсутствие перекрестных реакций
14/1	$6,25 \times 10^6$	+	1:10000	+	отсутствие перекрестных реакций
15/1	$7,8 \times 10^5$	+	1:40000	+	отсутствие перекрестных реакций
16/1	$6,25 \times 10^6$	+	1:5000	+	отсутствие перекрестных реакций
1/2; 2/2; 7/2-9/2; 14/2, 16/2	Отсутствие четко сформированного отрицательного контроля				

Примечание: «К⁻» – отрицательный контроль; «+» – отрицательный контроль в виде «пуговки».

Для дальнейшей работы нами выбрана среда № 15/1, так как она многокомпонентная и предотвращает разрушение диагностикумов при замораживании и лиофилизации, а также позволяет сохранять нативные свойства препаратов и после растворения.

Аналогичным способом переводили в среду высушивания № 15/1 и лиофилизировали 50 % формализированные эритроциты барана, предварительно разлив их по 2,0 мл во флаконы. При контроле физико-химических показателей препарат соответствовал требованиям, предъявляемым к лиофилизатам (ОФС.1.4.1.0031.18, ГОСТ Р 51352-2013 и ОФС.1.2.1.0010.15). 50 % формализированные эритроциты барана сухие в дальнейшем использовали для адсорбции гетерологичных гемагглютинирующих антител исследуемых сывороток, применяемых в РНГА с диагностикумом эритроцитарным туляреминым антигенным сухим. В качестве препарата сравнения – 50 % формализированные эритроциты барана жидкие, входящие в набор реагентов «РНГА-Тул-СтавНИПЧИ». Данные РНГА полностью совпадали при использовании жидкой и сухой форм.

По результатам проведенных исследований были получены и высушены по 5 серий (по 100 амп.) диагностикумов туляреминых эритроцитарных и 50 % формализированных эритроцитов барана. Препараты также контролировали по физико-химическим и иммунобиологическим показателям. Аналитическая чувствительность в РНГА диагностикума эритроцитарного туляреминого иммуноглобулинового сухого, проверенная

на 16 штаммах *F. tularensis*, составила $7,8 \times 10^5$ - $3,12 \times 10^6$ м.к./мл (макрометод) и $1,56 \times 10^6$ - $6,25 \times 10^6$ м.к./мл (микрометод); диагностикума эритроцитарного туляремийного антигенного сухого, при контроле 14 сывороток туляремийных, – 1:40000-1:80000 (макрометод) и 1:20000-1:40000 (микрометод). Установлено, что препараты специфичны и не дают перекрёстных реакций с гетерологичными пробами. Полученные результаты подтверждены при постановке реакции с препаратами: РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ (ФСР 2011/10270) и эритроцитарным диагностикумом иммуноглобулиновым туляремийным жидким (патент РФ № 2747420).

Таким образом, эффективный подбор композиционной среды высушивания, соблюдение вышеописанных параметров различных стадий процесса сублимационной сушки и герметизации диагностикумов туляремийных и 50 % формализированных эритроцитов гарантировало высокое качество высушенных диагностических препаратов, сохраняя исходные физико-химические и иммунобиологические показатели, а так же позволяя осуществлять постановку реакции без применения специальной разводящей жидкости.

Изучение стабильности и определение диагностической ценности наборов реагентов диагностикумов эритроцитарных туляремийных сухих

Были сконструированы наборы реагентов: 1. «ДЭТ-Иг», в состав которого входят: диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый 10 % сухой; положительный контрольный образец инактивированный (K^+) (1×10^9 м.к./мл) сухой и сыворотка диагностическая туляремийная сухая. 2. «ДЭТ-Аг», в составе которого: диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный 10 % сухой; положительный контрольный образец (K^+) инактивированный (1:10) сухой; 50 % формализированные эритроциты барана сухие; взвесь туляремийного микроба инактивированная сухая.

Срок годности и условия хранения устанавливали в ходе изучения стабильности лиофилизированных эритроцитарных диагностикумов в масштабе реального времени (*shelf life*) и методом «ускоренного старения» в соответствии с нормативными документами.

При применении метода «ускоренного старения» экспериментальные образцы эритроцитарных препаратов выдерживали при температуре: $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 116 сут и контролировали по физико-химическим и иммунобиологическим показателям с интервалом 15 дней; $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 47 сут – 10 дней. Для вычисления срока годности (С) использовали формулу зависимости Вант-Гоффа: $C = K \times C_0$, где К – коэффициент соответствия; C_0 – экспериментальный срок годности, сут. В результате срок годности при экспериментальной температуре $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ ($K=6,3$) составил 730,8 сут; при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ($K=15,6$) – 733,2 сут.

При применении метода долгосрочных испытаний контрольные исследования экспериментальных серий наборов реагентов при хранении в потребительской упаковке с учетом регламентированной температуры (5 ± 3) °С проводили через каждые 3 месяца в течение первого года хранения и 6 месяцев в течение заявленного периода испытаний. Установлено, что все образцы сохраняли стабильность в течение 24 месяцев наблюдения. По окончании 30 месяцев хранения в некоторых образцах наблюдалось снижение аналитической чувствительности в 2 и более раза, что не соответствовало нормативной документации. На основании данных, полученных в ускоренных и долгосрочных испытаниях, можно рекомендовать срок годности наборов реагентов в течение двух лет.

При изучении стабильности наборов реагентов также учитывали температуры различных климатических зон и основные показатели качества после растворения компонентов набора в процессе использования. Были проведены контрольные исследования при имитации условий транспортирования в потребительской упаковке с учетом регламентированной температуры в условиях повышенных (37 ± 1) °С, (25 ± 4) °С и пониженных температур минус (5 ± 1) °С, (18 ± 1) °С, (37 ± 1) °С соответственно и при хранении после вскрытия компонентов набора в процессе использования в условиях температуры (5 ± 3) °С. Исследования проводили через каждые 24 ч хранения. По совокупности полученных результатов установлено, что наборы реагентов «ДЭТ-Иг» и «ДЭТ-Аг» допускается транспортировать при различных температурах в течение 30 сут и хранить препараты после вскрытия при температуре (5 ± 3) °С в течение 8 сут, что отражено в разработанной эксплуатационной документации.

Диагностическую ценность набора реагентов «ДЭТ-Иг» проверяли на полевом материале (вода, экскременты мышевидных грызунов, погадки хищных птиц, мумифицированный труп полевки, органы и смывы с грудной полости павших животных). Всего исследовано 73 пробы (21 проба – положительная, 52 пробы – отрицательные, подтвержденные коммерческими препаратами в иммуноферментном анализе с магноиммуносорбентом (ИФА-МИС) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). В результате было установлено, что диагностическая чувствительность составила 90 % (из 21 пробы 19 были положительными). Диагностическая специфичность – 96 % (гемагглютинация не наблюдалась в 50 пробах из 52). Таким образом, в ходе испытаний экспериментальных серий набора реагентов «ДЭТ-Иг» установлено его соответствие назначению, а именно: обнаружению возбудителя туляремии в объектах окружающей среды в РНГА.

Диагностическую ценность набора реагентов «ДЭТ-Аг» определяли на 49 пробах клинического материала, из них 29 проб были положительными и 20 проб отрицательными (подтверждены коммерческими препаратами в иммуноферментном анализе (ИФА) и реакции

агглютинации (РА). Были получены положительные результаты в 27 пробах из 29, что составило 93 % диагностической чувствительности. Диагностическая специфичность – 90 %, так как из 20 проб в 18 – был отрицательный результат. Таким образом, в ходе испытаний было установлено соответствие набора реагентов «ДЭТ-Аг» назначению, а именно: анализу сывороток крови человека на наличие специфических антител к *F. tularensis* в РНГА.

Обработка и статистический анализ с использованием языка R (версия 4.0.2) представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Статистический анализ результатов испытания «ДЭТ-Иг» и «ДЭТ-Аг»

Результат «ДЭТ-Иг»	Результат эталонных методов (ПЦР и ИФА-МИС)		Результат «ДЭТ-Аг»	Результат эталонных методов (РА и ИФА)	
	Положительный	Отрицательный		Положительный	Отрицательный
Положительный	19	2	Положительный	27	2
Отрицательный	2	50	Отрицательный	2	18

Для «ДЭТ-Иг» чувствительность составила 90,47 % (95 % доверительный интервал 69,62-98,82 %); специфичность – 96,15 % (95 % доверительный интервал 86,79-99,53 %); точность – 94,52 % (95 % доверительный интервал 86,56-98,49 %). Для «ДЭТ-Аг» чувствительность составила 93,10 % (95 % доверительный интервал 77,23-99,15 %); специфичность – 90,00 % (95 % доверительный интервал 68,30-98,77 %); точность – 91,84 % (95 % доверительный интервал 80,40-98,73 %).

Оценка плотности связи между результатами выявления возбудителя туляремии и специфических антител, полученными с помощью экспериментальных диагностикумов и эталонных методов, представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Оценка плотности связи между результатами выявления возбудителя туляремии и специфических антител

Наименование	τ -b Кендалла	p
«ДЭТ-Иг»	0,8663004	$1,97 \cdot 10^{-13}$
«ДЭТ-Аг»	0,8310345	$8,533 \cdot 10^{-9}$

Согласно критериям τ -b Кендалла между результатами эталонных методов и данными, полученными при использовании разработанных экспериментальных диагностикумов, существует прямая, сильная связь (корреляционная зависимость).

Таким образом, отсутствие статистически значимого различия и наличие прямой сильной корреляционной связи между данными эталонных методов и экспериментальных диагностикумов, свидетельствуют о том, что эти методы позволяют получить близкие по значимости результаты при обнаружении антигена в биологическом материале и объектах окружающей среды и специфических антител в сыворотках животных и людей больных, переболевших, вакцинированных против туляремии.

Проведение менеджмента рисков при производстве и использовании наборов реагентов «ДЭТ-Иг» и «ДЭТ-Аг»

Разработанные наборы реагентов «ДЭТ-Аг» и «ДЭТ-Иг» относятся к 3 классу потенциального риска применения наборов, в связи с чем, согласно Постановлению Правительства РФ от 9 февраля 2022 г. № 136, необходимо проведение менеджмента рисков на всех этапах жизненного цикла медицинских изделий, включающего производство, контроль, хранение и транспортировку готового продукта, использование в практике и утилизацию. В связи с этим, был проведен менеджмент рисков в соответствии с требованиями ГОСТ ISO 14971-2021 с использованием стандартизованного FMEA (Примак Е.В. с соавт., 2011).

Идентификацию рисков, связанных с производством и контролем наборов реагентов «ДЭТ-Иг» и «ДЭТ-Аг», проводили с использованием разработанных и утвержденных опытно-промышленных регламентов и стандартных операционных процедур, а также производственных записей. Анализировали общую блок-схему (рисунок 2), технологические процессы и разделы технологического контроля.

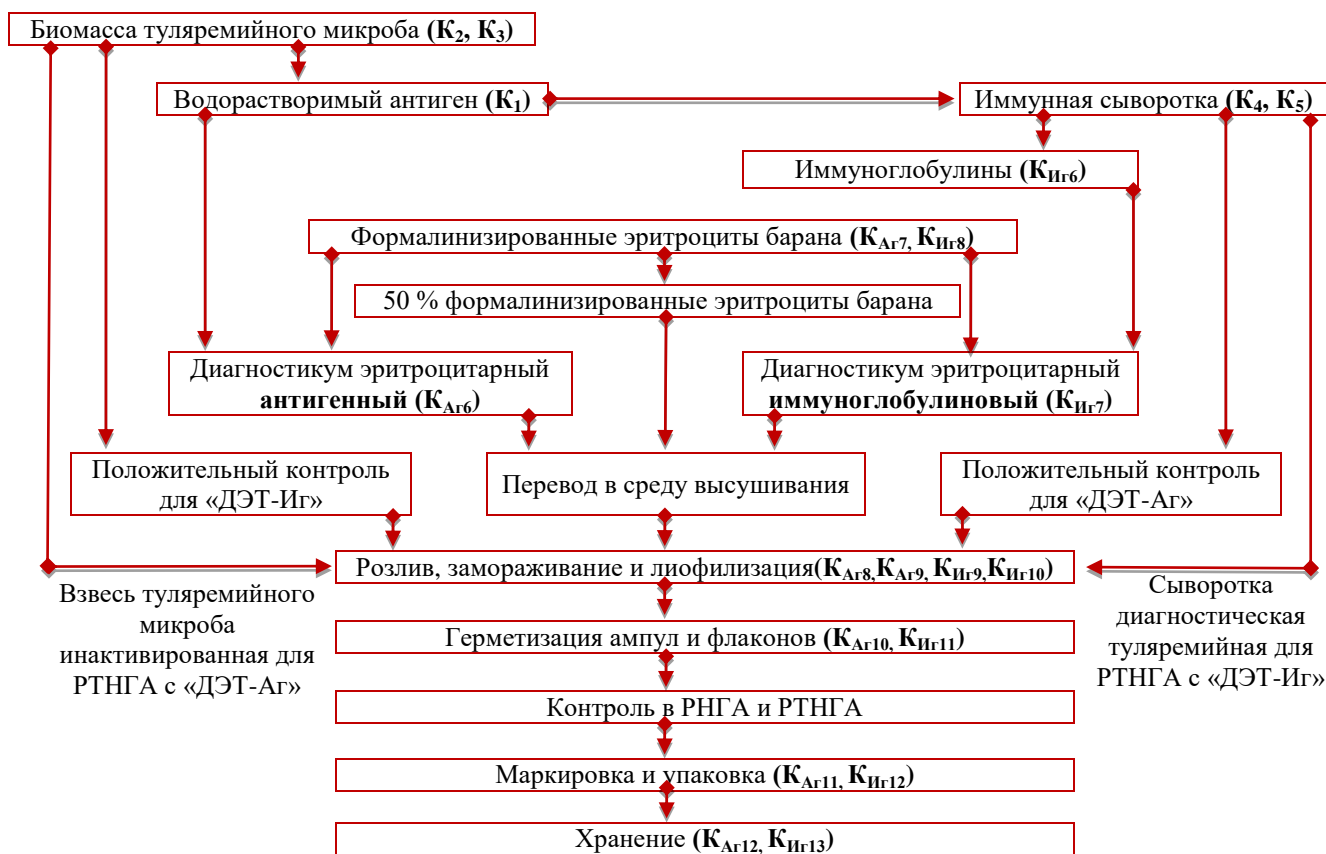


Рисунок 2 – Блок схема «ДЭТ-Аг» и «ДЭТ-Иг»

(К – критические контрольные точки; K_{Аг} – критические контрольные точки «ДЭТ-Аг»; K_{Иг} – критические контрольные точки «ДЭТ-Иг»)

Биотехнология производства набора реагентов «ДЭТ-Аг» состоит из 6 технологических процессов, каждый из которых включает ряд подготовительных и вспомогательных работ. В результате анализа производства «ДЭТ-Аг» были выделены 12

критических контрольных точек (К) по каждому отдельно учитываемому опасному фактору. Биотехнология производства набора реагентов «ДЭТ-Иг» состоит из 7 технологических процессов, включающих подготовительные и вспомогательные работы. В результате анализа производства «ДЭТ-Иг» были выделены 13 критических контрольных точек (К) по каждому отдельно учитываемому опасному фактору. Операции подготовительных и вспомогательных работ в технологических процессах с ничтожно малой вероятностью возникновения опасностей в анализе не учитывались.

Анализируя вышесказанное, определены возможные причины возникновения и последовательность событий по каждому опасному фактору производственного процесса и в совокупности записей документально отражены в файле менеджмента рисков. Для удобства проведения дальнейшего анализа данные риски объединены и идентифицированы как «Ошибки в технологическом процессе при производстве».

Учитывая, что производство и контроль рассматриваемых препаратов связаны с использованием микроорганизмов II группы патогенности, а применение готового препарата не должно причинять вреда здоровью человека и окружающей среде, отдельно были выделены опасности, которые могут возникнуть при работе с препаратами и их утилизации. В результате мониторинга данных было выявлено шесть уровней вероятных опасностей возникновения риска (R_1 - R_6), рассмотрены возможные причины их возникновения и возможные последствия воздействия риска: R_1 – ошибки в технологическом процессе при производстве наборов реагентов; R_2 – ошибки при маркировке компонентов наборов; R_3 – нарушение правил хранения и транспортировки наборов реагентов; R_4 – ошибки в рабочем ходе при использовании наборов реагентов; R_5 – угроза для здоровья обслуживающего персонала при работе с наборами реагентов в лаборатории; R_6 – опасность отходов, риск, связанный с обработкой отходов. Для визуального воспроизведения выделенных рисков использовали «Матрицу последствий и вероятностей» (рисунок 3).

		Качественный уровень опасности (S)				
		1 Очень небольшой	2 Малый	3 Серьезный	4 Критический	5 Катастрофический
Уровень (P) вероятности	5 Частый					
	4 Вероятный		R_2			
	3 Случайный		R_6	R_1, R_3	R_4, R_5	
	2 Незначительный					
	1 Невероятный					

Примечание:

$K_r \leq 4$	Риск приемлемый. Риск можно принять без мер по исправлению, корректирующих мероприятий не требуется.
$9 \geq K_r \geq 5$	Риск допустимый и контролируемый. В производственные процессы необходимо ввести корректирующие меры для снижения риска.
$K_r \geq 10$	Риск значимый. Выполнение работ запрещено, следует провести мероприятия по снижению риска до допустимого уровня.

Рисунок 3 – Матрица последствий и вероятностей для количественного определения оцененных рисков

Разработанная матрица дает представление, какой риск требует дальнейшего или более подробного анализа, какой риск необходимо обрабатывать в первую очередь, а какой следует рассматривать на более высоком уровне менеджмента. Входными данными к процессу являются шкалы опасности и вероятности, установленные в соответствии с выделенными рисками. Уровни опасности (S) и вероятности (P) возникновения каждого опасного фактора оценивали по пятибалльной шкале. Уровень опасности располагали в порядке возрастания риска, а уровень вероятности – в порядке убывания.

Количественную оценку рисков проводили на основе вычисления коэффициента риска (Kr) по формуле (Трохимчук В.В. с соавт., 2018): $Kr=S \times P$, где Kr – коэффициент риска; S – уровень опасности возникновения риска; P – уровень вероятности возникновения риска.

В таблице 5 представлены идентификация, причины возникновения, последствия значимых рисков и мероприятия по их снижению, приведены корректирующие действия для рисков R₄, R₅, имеющих значимый уровень.

Таблица 5 – Идентификация, причины возникновения, последствия значимых рисков и мероприятия по их снижению

№ риска	R ₄			R ₅		
Опасность/ Идентификация риска	Биологическая, химическая/Ошибки в рабочем ходе при использовании препарата			Биологическая/Угроза для здоровья обслуживающего персонала при работе с препаратом в диагностической лаборатории		
Возможная причина возникновения риска	Непрофессиональный подход при использовании набора			Нарушение требований действующих санитарных правил и инструкции по применению набора		
Возможные последствия воздействия риска	Использование непредусмотренных для данного изделия видов анализируемого биологического материала. Несоблюдение условий хранения компонентов в процессе использования набора			Незащищенный контакт с биологическим материалом, нарушение методики пробоподготовки, в том числе использование непредусмотренной для работы с набором		
Оценка рисков	P ₃	S ₄	Kr ₁₂	P ₃	S ₄	Kr ₁₂
Корректирующие действия	Внесение в инструкцию по применению перечня допустимых видов биологических проб. Внесение в инструкцию по применению информации о сроках годности приготовленных для работы растворов			Указание отдельным разделом в инструкции по применению мер безопасности при работе с биологическим материалом		
Оценка рисков	P ₂	S ₄	Kr ₈	P ₂	S ₄	Kr ₈

Примечание: P – оценка вероятности возникновения риска; S – оценка опасности возникновения риска; Kr – коэффициент риска

Как видно из таблицы, внедрение рекомендованных действий позволит сократить риск путем проведения контролей параметров при выходе конечного продукта из процесса производства и перевести его из категории значимого в категорию допустимого. Все идентифицированные риски были оценены, снижены до приемлемого уровня. Остаточные риски находятся в приемлемой зоне риска.

Для оценки эффективности разработанных корректирующих действий, отслеживания выявленных рисков и идентификации новых проводился мониторинг рисков. На данном этапе осуществлялся пересмотр решений по принятию риска, а также наблюдение за выполнением принятых мер по их уменьшению или устранению. С целью систематизации записей и других документов, созданных в процессе менеджмента риска, разработан файл и отчет менеджмента риска, которые являются ключевыми элементами при завершении разработки менеджмента и составляют неотъемлемую часть документального оформления процесса управления рисками.

Таким образом, проведена идентификация, оценка и анализ рисков, связанных с производством и применением наборов реагентов «ДЭТ-Аг» и «ДЭТ-Иг» на протяжении всего жизненного цикла. Риски R₄-R₅, внесенные в категорию значимых, после проведения корректирующих действий были снижены до допустимого уровня. Управление данной категорией рисков основано на обеспечении постпроизводственного мониторинга и контроля проведения мероприятий. Принятые меры по управлению допустимыми рисками (R₁, R₂, R₃, R₆) способствовали снижению их экспертной оценки до категории приемлемых. Согласно критериям, установленным в «Матрице последствий и вероятностей», польза от предусмотренного применения наборов реагентов превышает остаточный риск. Информация об остаточном риске учтена при разработке технической и эксплуатационной документации разработанных препаратов. На основании технологических процессов, информации по рискам и принятых мер по их уменьшению или устранению лиофилизированных препаратов оформлена и утверждена нормативная документация «ДЭТ-Аг» и «ДЭТ-Иг» (ПУР, ТУ, инструкции по применению, маркировки).

В итоге проведённых диссертационных исследований подтверждены основные биотехнологические подходы к разработке, изучению, производству лиофилизированных наборов реагентов диагностикомов эритроцитарных для индикации туляремии и детекции ее возбудителя, включающие: подбор сред высушивания, компоновку их состава, отработку режимов и схем лиофилизации, контроль аналитической чувствительности и специфичности, определение стабильности, диагностической ценности и проведение менеджмента рисков с определением возможных причин возникновения и последовательности событий по каждому опасному фактору производственного процесса, которые учтены при производстве серий препаратов и составлении нормативной документации.

ВЫВОДЫ

1. Подобран эффективный комплекс среды высушивания на основе углевода (сахароза), коллоида (желатин), антиоксиданта (тиомочевина), консерванта (азид натрия) и ПАВ (твин 80), позволяющий предохранять эритроцитарные препараты от разрушения во время

замораживания, лиофилизации и проводить постановку РНГА без использования разводящей жидкости.

2. Для сохранения физико-химических и иммунобиологических свойств эритроцитарных препаратов разработан режим лиофилизации при ускорении удаления свободной и связанной влаги в течение (13 ± 1) ч за счёт глубокого вакуума 0,15-0,25 мбар (15-25 Па), низкой температуры конденсатора – минус 80-90 °С и плавного подвода тепла до 30 °С.

3. Применение разработанного метода стабилизации обеспечивает получение специфичных и высокоактивных наборов реагентов («ДЭТ-Иг» с аналитической чувствительностью $3,12 \times 10^6$ - $6,25 \times 10^6$ м.к./мл и «ДЭТ-Аг» – 1:20000-1:40000) со сроком годности 2 года, возможностью транспортирования 30 сут при различных температурных режимах (от минус 37 °С до 37 °С).

4. Подтверждена диагностическая ценность разработанных наборов диагностикумов эритроцитарных туляремийных сухих на клиническом и полевом материале. Диагностическая чувствительность составила 90 % («ДЭТ-Иг») и 93 % («ДЭТ-Аг»), диагностическая специфичность – 96 % («ДЭТ-Иг») и 90 % («ДЭТ-Аг»).

5. Впервые разработан последовательный алгоритм внедрения системы риск-менеджмента в производство диагностических наборов с учетом проведенного исследования критических точек, что позволило в целях визуализации результатов исследования предложить вариант карты управления рисками на производстве в матричной форме. Выявленные риски минимизированы и учтены при разработке технической (пусковые регламенты, технические условия) и эксплуатационной документации (инструкции по применению, маркировки).

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Разработанный состав защитной среды (сахароза, желатин, тиомочевина, азид натрия, твин 80) может быть успешно использован для сохранения нативных свойств эритроцитарных препаратов при замораживании, лиофилизации и для упрощения постановки РНГА.

2. Для увеличения срока годности наборов реагентов диагностикумов эритроцитарных туляремийных жидких, с возможностью их хранения и транспортирования при любых температурных режимах, необходимо использовать эффективный ускоренный режим лиофилизации (13 ± 1) ч при низкой температуре конденсатора – минус 80-90 °С, глубоком вакууме – 0,15-0,25 мбар (15-25 Па), плавном подводе тепла до 30 °С и проводить герметизацию ампул и флаконов путем опая и завальцовки соответственно.

3. Предложенные схемы проведения процесса менеджмента риска могут быть использованы как типовые при разработке медицинских изделий для диагностики *in vitro* с учетом

специфики каждого отдельного производства. Отчетные документы, разработанные в рамках системы, применимы при инспекционной проверке надлежащей производственной практики и в части комплектации регистрационного досье диагностического препарата с последующей регистрацией в системе здравоохранения Российской Федерации.

4. Для мониторинговых эпидемиологических обследований природных очагов и вспышек туляремии рекомендуется использовать разработанные наборы реагентов «ДЭТ-Иг» и «ДЭТ-Аг» после их регистрации в Росздравнадзоре.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Жарникова, И.В. Сравнительная характеристика биотехнологии получения эритроцитарных и латексных диагностикумов для выявления возбудителя туляремии / И.В. Жарникова, Е.В. Жданова, Т.В. Жарникова, О.Л. Старцева, С.А. Курчева, А.С. Геогджаян, А.А. Семирчева, **А.Г. Кошкидько**, Ю.Ю. Гаркуша // Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Биол. Овчинникова. – 2019. – № 15 (4). – С. 27-31.

2. **Кошкидько**, А.Г. Разработка защитной среды высушивания для стабилизации эритроцитарного антигенного туляремийного диагностикума / **А.Г. Кошкидько**, С.А. Курчева, И.В. Жарникова, О.Л. Старцева // Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Биол. Овчинникова. – 2020. – № 16 (4). – С. 12-16.

3. **Кошкидько**, А.Г. Оценка применения эритроцитарного диагностикума (лиофилизата) при выявлении возбудителя туляремии в природных очагах / **А.Г. Кошкидько**, С.А. Курчева, И.В. Жарникова, А.А. Зайцев, О.А. Гнусарева, О.Л. Старцева, А.Ю. Газиева, Е.В. Жданова, Т.В. Жарникова, Д.В. Русанова // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2021. – № 4. – С. 79-83.

4. Старцева, О.Л. Менеджмент риска при производстве и использовании медицинского изделия для диагностики *in vitro* набора реагентов «Диагностикум эритроцитарный антигенный туляремийный лиофилизированный» / О.Л. Старцева, Ю.В. Богданова, Т.М. Гридина, С.А. Курчева, **А.Г. Кошкидько**, А.С. Степанищева // Пробл. Особо Опасн. Инф. – 2022. – № 2. – С. 115-121.

5. Курчева, С.А. Разработка защитной среды высушивания и режима лиофилизации для стабилизации диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового / С.А. Курчева, **А.Г. Кошкидько**, И.В. Жарникова, Д.В. Русанова, А.А. Семирчева, О.Л. Старцева, Е.В. Жданова, М.М. Курноскина, И.С. Тюменцева // Биопр. Проф., диагн., леч. – 2022. – № 22 (2). – С. 196-207.

6. **Кошкидько**, А.Г. Оценка показателей качества лиофилизированного набора реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный сухой» («ДЭТ-Аг») / **А.Г. Кошкидько**, И.В. Жарникова, Е.В. Жданова, Д.В. Русанова, О.А. Гнусарева, М.М.

Курноскина, С.А. Курчева, О.В. Васильева, Т.В. Жарникова // Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Биол. Овчинникова. – 2023. – № 19 (2). – С. 6-12.

Патенты

1. Патент 2708636 Российская Федерация, МПК G01N33/531. Универсальная среда высушивания для стабилизации эритроцитарных диагностикумов туляремийных // И.В. Жарникова, С.А. Курчева, Е.В. Жданова, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, Т.В. Жарникова, О.Л. Старцева, **А.Г. Кошкидько**, А.С. Геогджаян, Ю.Ю. Гаркуша; патентообладатель ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2019124600; заявл. 30.07.2019; опубл. 10.12.2019; Бюл. № 34. – 7 с.
2. Патент 2747420 Российская Федерация, МПК G01N33/531. Способ приготовления эритроцитарного диагностикума иммуноглобулинового туляремийного // И.В. Жарникова, **А.Г. Кошкидько**, С.А. Курчева, Е.В. Жданова, О.Л. Старцева, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, А.А. Семирчева, А.С. Геогджаян, Т.Л. Красовская; патентообладатель ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2020124885; заявл. 17.07.2020; опубл. 04.05.2021; Бюл. № 13. – 10 с.
3. Патент 2749355 Российская Федерация, МПК G01N33/531. Способ лиофилизации эритроцитарных диагностикумов туляремийных // **А.Г. Кошкидько**, И.В. Жарникова, С.А. Курчева, Е.В. Жданова, А.А. Семирчева, А.С. Геогджаян, Т.В. Жарникова, О.Л. Старцева, Ю.В. Богданова; патентообладатель ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2020124880; заявл. 17.07.2020; опубл. 09.06.2021; Бюл. № 16. – 9 с.

Прочие публикации

1. Курчева, С.А. Биотехнологические разработки стабилизации диагностикума эритроцитарного туляремийного / С.А. Курчева, И.В. Жарникова, О.Л. Старцева, И.С. Тюменцева, Е.В. Жданова, Е.Н. Афанасьев, **А.Г. Кошкидько**, А.С. Геогджаян, Ю.Ю. Гаркуша, С.М. Кальной // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: матер. III Всеросс. науч.-практ. конф. с международным участием, 24-25 апреля 2019 г., Ставрополь – Экспо-Медиа. – 2019. – С. 278-279.
2. **Кошкидько, А.Г.** Стабилизация эритроцитарного антигенного туляремийного диагностикума / **А.Г. Кошкидько**, С.А. Курчева, И.В. Жарникова, О.Л. Старцева, Е.В. Жданова, А.А. Семирчева, А.С. Геогджаян, М.М. Курноскина, Ю.В. Богданова // Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания: материалы VII Всеросс. междисциплинарной науч.-практ. конф. с международным участием, 28-30 октября 2020 г., Краснодар – Новация. – 2020. – С. 100-101.
3. Старцева, О.Л. Анализ рисков при производстве и использовании медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляремийный

лиофилизированный» / О.Л. Старцева, Ю.В. Богданова, Т.М. Гридина, А.С. Степанищева, **А.Г. Кошкидько** // Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы: сбор. науч. Труд. Всеросс. науч.-практ. конф.с международным участием, посвященной 100-летию академика И.Н. Блохиной, 26-27 апреля 2021 г., Нижний Новгород – Медиаль. – 2021. – С. 415-417.

4. Кошкидько, А.Г. Конструирование эритроцитарного антигенного туляремийного диагностикума в лиофилизированной форме / **А.Г. Кошкидько**, А.А. Семирчева, М.М. Курноскина // Горизонты биотехнологии: материалы Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, декабрь 2020 г., Орел – ОГУ имени И.С. Тургенева. – 2021. – С. 132-135.

5. Кошкидько, А.Г. Прогнозирование срока годности набора реагентов диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового сухого методом «ускоренного старения» / **А.Г. Кошкидько**, С.А. Курчева, О.Л. Старцева, Д.В. Русанова // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: сбор. труд. XIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского, 24-26 мая 2021 г., Москва – Медицинское маркетинговое агентство. – 2021. – С. 199.

6. Кошкидько, А.Г. Разработка и апробация лиофилизированного эритроцитарного диагностикума для выявления возбудителя туляремии / **А.Г. Кошкидько**, С.А. Курчева, И.В. Жарникова, Д.В. Русанова, А.Ю. Евченко, М.М. Курноскина, А.А. Семирчева, А.С. Геогджаян, О.Л. Старцева // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: матер. XIII Всеросс. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, 15-17 сентября 2021 г., Екатеринбург – ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора. – 2021. – С. 272-274.

7. Кошкидько, А.Г. Оценка физико-химических и иммунобиологических показателей (аналитические чувствительность и специфичность) эритроцитарного антигенного туляремийного диагностикума лиофилизированного / **А.Г. Кошкидько**, И.В. Жарникова, Е.В. Жданова, Д.В. Русанова, О.А. Гнусарева // Бактериология: мат. VII Национального конгресса бактериологов, посвященного 100-летию со дня образования Государственной санитарной службы России, 28-30 сентября 2022 г., Санкт-Петербург – Династия. – 2022.– С. 40.

8. Кошкидько, А.Г. Сравнительная характеристика диагностических препаратов на твердофазной основе для диагностики туляремии, бруцеллеза и детекции их возбудителей / **А.Г. Кошкидько**, А.Д. Беседин, Т.В. Жарникова, М.М. Курноскина, Д.В. Русанова // Вест. мол. уч. – 2022. – № 3. – С. 90-93.