

ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЁННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«СТАВРОПОЛЬСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ
ИНСТИТУТ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

Кошкидько Александра Геннадьевна

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

1.5.6. Биотехнология

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Жарникова И.В.

Ставрополь – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1 Конструирование диагностических препаратов для серологической и иммунохимической диагностики туляремии и индикации ее возбудителя.....	18
1.2 Метод стабилизации биопрепаратов путем лиофилизации.....	23
1.3 Менеджмент рисков при производстве и использовании препаратов	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.1 Материалы.....	40
2.2 Методы исследования.....	50
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА КОМПОНЕНТОВ ЗАЩИТНЫХ СРЕД, СХЕМ ЛИОФИЛИЗАЦИИ ДИАГНОСТИКУМОВ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ ТУЛЯРЕМИЙНЫХ, 50 % ФОРМАЛИНИЗИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ БАРАНА И КОНТРОЛЬ ИХ СВОЙСТВ	57
3.1 Стабилизация диагностикумов эритроцитарных туляремийных, 50 % формализированных эритроцитов барана путем подбора защитной среды высушивания и схемы лиофилизации.....	57
3.2 Контроль физико-химических показателей и определение аналитической чувствительности и специфичности лиофилизированных препаратов.....	66
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДИАГНОСТИКУМОВ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ ТУЛЯРЕМИЙНЫХ СУХИХ	85
4.1 Изучение стабильности функциональных характеристик лиофилизированных форм выпуска эритроцитарных препаратов	85
4.2 Контроль и определение диагностической ценности набора реагентов диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового сухого	93
4.3 Контроль и определение диагностической ценности набора реагентов диагностикума эритроцитарного туляремийного антигенного сухого	97

ГЛАВА 5. ПРОВЕДЕНИЕ МЕНЕДЖМЕНТА РИСКОВ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДИАГНОСТИКУМОВ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ ТУЛЯРЕМИЙНЫХ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ.....	104
5.1 Мониторинг и контроль над рисками	104
5.2 Оформление файла и отчета по менеджменту рисков	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	119
ВЫВОДЫ	128
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	129
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	130
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	159
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	172

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

Аг	–	антиген
Ат	–	антитела
БСА	–	бычий сывороточный альбумин
ВР	–	вспомогательные работы
Да (Da)	–	дальтон
ДИА	–	дот-вариант иммуноферментного анализа
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДПО	–	дополнительное профессиональное образование
«ДЭТ-Аг»	–	набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный сухой»
«ДЭТ-Иг»	–	набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый сухой»
ИФА	–	иммуноферментный анализ
ИФА-МИС	–	иммуноферментный анализ с магноиммуносорбентом
К ⁺	–	положительный контроль
К ⁻	–	отрицательный контроль
К ₁₋₁₂ , К ₁₋₁₃	–	контрольная точка
ЛБТК	–	лаборатория биологического и технологического контроля
мбар	–	миллибар
МГА	–	микроравиметрический анализ
МИБП	–	медицинские иммунобиологические препараты
МИ ИВД	–	медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i>
МИС	–	магноиммуносорбент
м.к.	–	микробная клетка
м.к./мл	–	микробная клетка в миллилитре
мкм	–	микрометр
МкАт	–	моноклональные антитела
МПА	–	мясо-пептонный агар
МПБ	–	мясо-пептонный бульон
МР	–	методические рекомендации
НД	–	нормативная документация
НИР	–	научно-исследовательская работа
об/мин	–	обороты в минуту
ОСО	–	отраслевой стандартный образец мутности (ОСО мутности)

ООИ	–	особо опасные инфекции
ОПР	–	опытно-промышленный регламент
ОФС	–	общая фармакопейная статья
Па	–	паскаль
ПАВ	–	поверхностно-активные вещества
ПБ	–	пьезобиосенсорные устройства
ПВП	–	поливинилпирролидон
ПКР	–	пьезокварцевые резонаторы
ПР	–	промышленный регламент
ПУР	–	пусковой регламент
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
ПЭГ	–	полиэтиленгликоль
РА	–	реакция агглютинации
РАЛ	–	реакция агглютинации латекса
РИД	–	реакция иммунодиффузии
РИФ	–	реакция иммунофлуоресценции
РНГА	–	реакция непрямой гемагглютинации
«РНГА-Тул-Аг- СтавНИПЧИ»	–	набор реагентов Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный жидкий
РНИФ	–	реакция непрямой иммунофлуоресценции
РСА	–	реакция суспензионной агглютинации
РТНГА	–	реакция торможения непрямой гемагглютинации
РУ	–	регистрационное удостоверение
С	–	срок годности
С ₃	–	экспериментальный срок годности
СанПиН	–	санитарные правила и нормы
СМК	–	система менеджмента качества
СОП	–	стандартная операционная процедура
ТП	–	технологический процесс
ТУ	–	технические условия
ФИТЦ	–	флуоресцеинизотиоцианат
ФКУЗ	–	Федеральное казённое учреждение здравоохранения
ФЛИА	–	флуоресцентный липосомальный иммуноанализ
А	–	температурный коэффициент скорости химической реакции
С	–	процент формальдегида в используемом растворе формалина
FMЕА	–	метод анализа видов и последствий потенциальных отказов
НУ	–	единица плотности излучения Хаунсфилда
К	–	коэффициент соответствия
К _r	–	коэффициент риска

LPS	–	липополисахарид
P	–	уровень вероятности возникновения риска
R ₁₋₆	–	уровень вероятных опасностей возникновения риска
S	–	уровень опасности возникновения риска
t _{хр}	–	температура хранения
t _э	–	температура экспериментального хранения
X	–	необходимое количество формалина в мл для формализации эритроцитов
Y	–	объем осадка отмытых эритроцитов
pH	–	отрицательный логарифм концентрации водородных ионов

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Основными приоритетами государственной политики является охрана здоровья населения как важнейшего фактора национальной безопасности и обеспечение биологической безопасности, предусматривающей в том числе: реализацию комплекса профилактических и противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение распространения природно-очаговых инфекций и зоонозных болезней, а также обеспечение готовности к реагированию на биологические угрозы естественного и преднамеренного характера; развитие системы мониторинга биологической обстановки на территории Российской Федерации (РФ) [90].

Среди природно-очаговых инфекций важное место занимает туляремия, заболеваемость которой имеет международное значение. Показатели заболеваемости на территории РФ, сопредельных государств и в мире в целом остаются стабильно высокими. Планирование и проведение профилактических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения случаев заболевания туляремией среди людей, на сегодняшний день, продолжает сохранять свою актуальность [63].

Несмотря на почти столетний период изучения эпизоотологических и эпидемиологических особенностей возбудителя туляремии, предотвратить массовые вспышки заболевания людей во всем мире до сих пор не удается [64].

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. При этом, как правило, на практике предпочтение отдается серологическим и молекулярно-генетическим методам, которые характеризуются экспрессностью, высокой специфичностью, чувствительностью, адаптированным для прямого исследования самых разнообразных объектов биотической и абиотической природы. Поскольку выделение *Francisella (F.) tularensis* является трудоемким процессом, а

обнаружение ДНК возбудителя обычно требует использования инфицированных тканей, серологические методы чаще всего применяются для подтверждения диагноза [192].

Стремительное развитие биотехнологии в последние годы привело к появлению новых методов исследования [4, 71, 79, 147, 170, 211], однако огромное значение в лабораторной диагностике имеет хорошо известная реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) [48, 73, 131]. Актуальным остается как разработка эритроцитарных диагностикумов, за счет простоты производства, применения и доступности сырья, 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 туляремийный антигенный жидкий («РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ») и набор реагентов Диагностикум эритроцитарный туляремийный 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 потере их биологической активности. География потребителей диагностических препаратов достаточно широка и включает регионы России с разными климатическими условиями, неблагоприятно отражающимися на качестве препаратов в жидкой форме при транспортировке.

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. В настоящее время значительное число коммерческих диагностических препаратов представлено в форме лиофилизатов. Однако в некоторых случаях даже успешно выполненная лиофилизация не является

гарантом необходимой стабильности препаратов. Более того, лиофильное высушивание, как и любой процесс, нуждается в оптимизации. 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. Необходимо подобрать такую защитную среду, которая бы позволяла использовать диагностикумы длительное время после получения восстановленного препарата без микробной контаминации, предотвращая как спонтанную агглютинацию, так и снижение чувствительности, обеспечивая хорошую растворимость и позволяя после растворения диагностикумов проводить постановку РНГА, исключив использование специальной разводящей жидкости.

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.

Биотехнология получения препаратов для диагностики особо опасных инфекций (ООИ) и индикации их возбудителей *in vitro* сопряжена с использованием биологического сырья, что представляет существенный риск при их производстве и применении в лабораторной практике. Выявление и устранение ошибок на ранних этапах производства с помощью менеджмента риска является неотъемлемой частью процессов обеспечения качества, гарантирующей безопасность конечного продукта [138].

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 [14].

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 [33, 48, 138]. А применение процесса менеджмента риска при производстве, контроле, хранении, транспортировании, использовании и утилизации препаратов будет способствовать уменьшению или устранению рисков в технологических процессах.

Все вышеизложенное определило цель и задачи работы.

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

Для достижения цели исследования были поставлены следующие **задачи:**

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 туляремиальных 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 туляремиальных сухих, что способствовало повышению качества препаратов.

Приоритетность выполненных исследований подтверждена 3 патентами РФ на изобретения: «Универсальная среда высушивания для стабилизации эритроцитарных диагностикумов туляремиальных» (№ 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 первичной и вторичной упаковки, 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, риски технологических процессов, 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 (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, мумифицированный труп полевки, 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 исследования

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 туляремиальных; 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 (получение, исследование материала, консультации) 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. Газиева 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Конструирование диагностических препаратов для серологической и иммунохимической диагностики туляремии и индикации ее возбудителя

Конструирование диагностических препаратов – сложный, многостадийный процесс, который во многом зависит от активности, специфичности лигандов (антигенов (Аг) и антител (Ат); качества твердофазных основ биотической и абиотической природы (эритроцитов, сорбентов, латексов, полистирольных планшет, нитроцеллюлозных мембран); красителей и ферментов; а также кинетических параметров иммобилизации и стабилизации.

Основным биологическим сырьем при получении диагностических препаратов являются иммунные сыворотки крови, полученные на основе антигенов, и специфические антигены, выделенные из микробных биомасс [48, 146].

Существуют различные способы извлечения специфических антигенов из микробных клеток, позволяющие изолировать полноценные в антигенном отношении фракции для производственных целей. Процедура получения антигенного материала зависит от степени растворимости и лабильности изучаемых белков. Для перевода антигенов в растворимое состояние применяют экстракцию трихлоруксусной кислотой, петролейным эфиром, солевыми растворами, ацетоном, хлороформом, фенолом, с помощью кислотного, щелочного гидролиза и т.д. Получаемые при этом экстракты имеют различные физико-химические, иммунохимические свойства и спектр антигенов [31, 32, 48].

В лабораторной практике наиболее популярными методами являются водно-фенольная экстракция липополисахарида (LPS) *F. tularensis* по методике О. Westphal [222], с последующей очисткой от примесей ультрацентрифугированием и обработкой протеолитическими ферментами, аффинной хроматографией [30] или частично очищенным экстракционным

буфером [203, 209, 226]. Не менее популярный метод – получение водорастворимого антигенного комплекса, экстрагируемого 2,5 % раствором натрия хлорида, состоящего из трех фракций, полученных высаливанием 80 % сульфатом аммония, механическим и ультразвуковым разрушением [145]. При разработке диагностических препаратов можно также использовать поверхностный протективный антигенный комплекс, полученный фракционированием водорастворимого пула компонентов внешних мембран сульфатом аммония с последующим осаждением в изоэлектрической точке (рН 4,3) [45, 66, 156] или белково-липополисахаридный антиген, выделенный из внешних мембран клеток *F. tularensis* путем многократного переосаждения на ультрацентрифуге с последующей гель-фильтрацией, диализом и концентрированием [153, 156] с помощью ультразвука для удаления «С»-комплекса с клеточной поверхности и многократного переосаждения в деионизированной воде на ультрацентрифуге [156, 157, 158]; экстрагированием неионным детергентом твин 80 с последующим дифференциальным центрифугированием и гель-хроматографией [42, 80, 95].

Для получения иммуноглобулинов, с целью дальнейшего конструирования диагностических препаратов, чаще применяют гипериммунную сыворотку, содержащую в наиболее высоком количестве (титре) антитела, по сравнению с иммунной сывороткой [122]. В качестве продуцентов используют в основном кроликов, иммунизируя живой культурой вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ и корпускулярным антигеном, состоящим из инактивированных культур *F. tularensis* вирулентных штаммов, с неполным адьювантом Фрейнда и без, с дальнейшим получением иммуноглобулинов класса G, осажденных насыщенным раствором сульфата аммония [84, 99] или водорастворимым антигеном с фераклином, тималином и циклофосфаном (тимогеном) [6], с последующим выделением иммуноглобулинов каприловой кислотой [146, 215], или методом фракционирования полиэтиленгликолем (ПЭГ) [145, 202]. Еще одними продуцентами для получения туляремийной сыворотки могут быть лошади, иммунизированные инактивированной формалином культурой

туляремийного микроба с фераклином [96], мыши – инактивированной формалином *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Ява) или *F. tularensis* subsp. *novicida* [211].

Дальнейшее конструирование диагностического препарата зависит от выявляемого объекта: от обнаружения антигена в биологическом материале и объектах окружающей среды и до специфических антител в сыворотках животных и людей больных, переболевших, вакцинированных против туляремии.

К методам ускоренной детекции относят реакцию РНГА, основным компонентом которой является диагностикум эритроцитарный, представляющий собой лиганд, иммобилизованный с формализированными эритроцитами барана [50, 99, 146]. Еще одной основой для диагностикума может быть кремнеземная матрица, например, аэросил или алюмосиликат, сенсibilизированный иммуноглобулинами, применяемый в реакции суспензионной агглютинации (РСА) [52, 98] или полиакролеиновый латекс, сенсibilизированный туляремийным лигандом, используемый в реакции агглютинации латекса (РАЛ) [43, 53, 118, 205, 206].

Для серодиагностики туляремии и определения специфических антител у вакцинированных против туляремии или переболевших туляремией, применяют диагностикум туляремийный жидкий для объемной и кровянокапельной реакции агглютинации, представляющий собой взвесь обеззараженных формалином туляремийных микробов вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [75].

За рубежом известен ускоренный метод обнаружения антител в сыворотках – реакция микроагглютинации, где в качестве диагностикума используется обеззараженная формалином культура туляремийного микроба, окрашенная гематоксилином [191], сафранином [166] или кристаллическим фиолетовым [203].

Широкое распространение получили методы, основанные на применении антител, меченных маркерами – флуорохромами, которые с помощью люминесцентного микроскопа позволяют проводить высокочувствительные определения исследуемой пробы по интенсивности свечения и морфологии микробной клетки в реакции иммунофлуоресценции (РИФ) [48, 203, 223]. В

качестве флуорохрома чаще применяется флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), превосходящий многие флуорохромы по интенсивности свечения и способности сохранять иммунные свойства антител. Изотиоцианаты флуоресцеинов связываются с белковыми молекулами преимущественно через аминокислотные остатки лизина. Метка белка ФИТЦ проводится в щелочной среде [48, 196]. Свободный флуоресцеин в щелочном растворе имеет высокий квантовый выход и обладает зеленой флуоресценцией. В реакции конъюгации в основном участвуют концевые аминокислотные группы белковой молекулы и аминокислотные группы лизина. После конъюгации происходит очистка от несвязавшегося красителя ФИТЦ аффинным сорбентом или сефадексом G-25 [51]. С целью совершенствования методов РИФ наблюдается тенденция получения флуоресцирующих иммуноглобулинов на основе моноклональных антител, что значительно увеличивает активность и специфичность метода [46, 48, 155].

Для выявления антител к возбудителю туляремии разработан метод флуоресцентного липосомального иммуноанализа (ФЛИА) на основе липосом, сенсibilизированных поверхностными антигенами микробных клеток с инкапсулированными маркерами флуоресцентной природы, превосходящие применяемые в практике иммунохимические реакции для выявления антител в 160 раз [135].

К наиболее информативным современным иммунодиагностическим тестам для обнаружения *F. tularensis* можно отнести различные варианты иммуноферментного анализа (ИФА). Это иммунологическая реакция специфического взаимодействия антигена и антитела, где в качестве индикатора используются молекулы фермента, конъюгированные с иммуноглобулинами G (полученными на основе поликлональных антител) [40, 146] или конъюгат фермента с моноклональными антителами (МкАт) [46, 151, 162, 209].

На основе МкАт разработан дог-вариант иммуноферментного анализа (ДИА), отличающийся от твердофазного ИФА на полистироловых планшетах большей экспрессностью, экономичностью в отношении расхода реагентов, простотой постановки и учета результатов [140]. Помимо этого, ИФА могут

применять с магноиммуносорбентом (ИФА-МИС), представляющим собой магнитную матрицу с иммобилизованными туляремийными антителами. Применение магноиммуносорбентов (МИС) позволяет добиться повышения эффективности анализа, увеличения чувствительности в 1000 раз и срока годности в 10 раз, по сравнению с традиционным ИФА. В качестве магнитной матрицы используют алюмосиликат и оксид железа (II), модифицированный 6 % раствором декстрана [18, 54, 146].

Также для обнаружения возбудителя туляремии используют различные иммунохимические методы анализа. Иммунохроматографические тест-системы основаны на применении коллоидного золота с иммобилизованными МкАт на нитроцеллюлозной мембране [46] или белком А [213, 214].

Перспективным методом детекции возбудителей является микрогравиметрический анализ (МГА) с применением пьезобиосенсорных (ПБ) устройств, позволяющих быстро реализовать процесс достоверного распознавания анализируемых молекул в образовавшемся комплексе антиген-антитело. При создании пьезобиосенсорных устройств используются пьезокварцевые резонаторы (ПКР) с золотыми электродами, активированные и иммобилизованные туляремийными иммуноглобулинами [49].

Большое внимание изложению современных методов лабораторной диагностики туляремийной инфекции у человека и животных, объектов окружающей среды уделено в монографии Поповой А.Ю., Мефодьева В.В., Степановой Т.Ф. (2016) [121]. А порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии и список необходимых для этого препаратов представлен в действующих МУК 4.2.2939-11 [76].

В настоящее время для повышения эффективности противоэпидемических и профилактических мероприятий при туляремийной инфекции, количество и качество диагностических препаратов часто бывает недостаточным для высокочувствительной, специфичной и экспрессной диагностики туляремии, возможности проводить исследования в полевых условиях, транспортировки и применения препаратов вне зависимости от климатических условий, наличия

дорогостоящего импортного оборудования и высококвалифицированных специалистов.

1.2 Метод стабилизации биопрепаратов путем лиофилизации

Лиофилизация – процесс удаления связанной и свободной влаги из замороженного материала путем возгонки (сублимации) льда в условиях вакуума [188]. При переходе льда непосредственно в пар биологический материал превращается в губчатую массу из белка и солей, объем которой равен объему первоначальной замороженной массы. При этом предотвращается агрегация молекул белка и воздействие на них высоких концентраций солей [89]. Все стадии процесса лиофилизации – замораживание, сублимация, досушивание – являются обязательными, и от правильно подобранных параметров зависит получение стабильных препаратов без потери их специфической активности. Время лиофилизации в значительной степени зависит от концентрации белка, объема препарата, давления в камере, температур материала и конденсации водяных паров, наличия и состава среды высушивания, а постоянство скорости удаления влаги – от постоянства подводимой энергии [2, 48, 81]. Для каждого лиофилизируемого препарата необходимо подбирать индивидуальную схему сушки с целью сохранения физико-химических и иммунобиологических свойств препаратов. Для некоторых препаратов наиболее характерно время лиофилизации (7 ± 1) ч [112], для других – (13 ± 1) ч [117], или (24 ± 2) ч [99, 101, 102, 104, 107, 125].

Многочисленные исследования [3, 12, 178] показали, что этапы замораживания и сушки в процессе лиофилизации могут повлиять на структуру и функцию белков лиофилизируемых препаратов, что приводит к потере их активности и устойчивости. Чтобы снизить воздействие множества повреждающих факторов в процессе замораживания биологических структур используют так называемые защитные вещества (среды высушивания), или криопротекторы.

Процесс замораживания в среде высушивания предотвращает денатурацию белков в высушиваемом материале, препятствует вспениванию его при создании глубокого вакуума в системе [89, 204].

Защитные среды должны отвечать следующим критериям: сохранять жизнеспособность, морфологические, биохимические, таксономические и генетические свойства биологических структур в процессе консервации и хранения; быть нетоксичными; гидрофильными; иметь хорошую растворимость в воде; низкую температуру эвтектики; предотвращать гиперконцентрирование солей в суспензии; стабилизировать водородные связи в кристаллической решетке и предотвращать формирование больших кристаллов льда [123, 126].

Применяемые в настоящее время среды высушивания характеризуются огромным разнообразием своего состава и различной химической природой [11, 41, 123, 126, 168]. Ряд авторов в качестве основного компонента сред высушивания часто применяет сахара [92, 102, 114, 179, 184, 195, 224], полимеры [102, 110], коллоиды (желатин) [35], иногда в сочетании с сахарами [7, 103, 106, 108, 111]. В качестве стабилизирующей среды высушивания также может применяться и белковый стабилизатор на основе водной эмульсии белка куриного яйца [105]. Некоторые авторы рекомендуют добавлять в среды высушивания антиоксиданты: 1 % аскорбиновую кислоту или 1 % тиомочевину [89].

Для уменьшения времени лиофилизации рекомендуют использовать растворы лактозы и сахарозы с добавлением 5 % и 10 % водных растворов трет-бутанола. Растворы с трет-бутанолом полностью замораживаются во всех лиофильных установках, а также быстро сублимируются [197].

Схематическое описание этапов процесса лиофилизации представлено на рисунке 1.

1 этап. Замораживание

Стадия замораживания – переход материала в твёрдое состояние при низких температурах. В течение этого наиболее критического периода жидкости либо кристаллизуются, либо концентрируются в аморфном состоянии, т.е. преобразуются в стекловидное состояние. Вода образует сложную ледяную сеть,

но некоторая её часть встроена в стекловидные структуры или остаётся более или менее прочно связанной с препаратом. Растворенные вещества концентрируются и могут окончательно выкристаллизоваться. В то же время, объемное расширение системы в сочетании с повышением осмотического давления, вызванным увеличением концентрации межкристаллического раствора, могут вызывать мощные механические напряжения, действующие на препарат [142]. При выборе способа замораживания и его режима надо правильно подобрать необходимую температуру замораживания, которая определяется эвтектической точкой раствора препарата или эвтектической зоной, температуру полного отвердевания (кристаллизации) замораживаемого объекта. Так, при температурах выше эвтектической точки в присутствии солей в белковых растворах может произойти денатурация белка. Однако слишком низкая температура значительно увеличивает продолжительность процесса сушки. Предварительное установление эвтектической температуры объектов высушивания является обязательным, так как позволяет определить допустимый уровень нагревания при лиофилизации препарата [16, 48, 62, 78, 219].

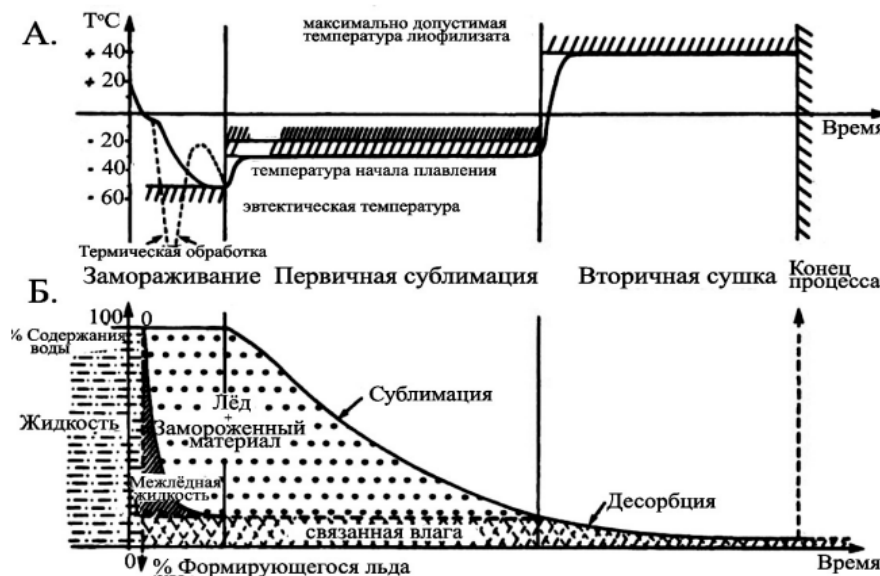


Рисунок 1 – Схематическое описание этапов процесса лиофилизации

(А) – температурные кривые;

(Б) – содержание воды в зависимости от времени [89]

Существуют различные методы определения эвтектических температур: термический метод, основанный на определении температуры замерзания и оттаивания растворов [93]; метод измерения удельного электрического сопротивления продукта, разработанный L. Rey [207]; метод с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии или дифференциального термического анализа [210].

Параметры замораживания зависят от физико-химических свойств препарата, загрузки, установки, «хладопроизводительности» и теплопередачи при замораживании, формы, величины и положения в пространстве ампул или флаконов, поэтому для каждого препарата определяются индивидуально с целью подбора условий, обеспечивающих максимальную сохранность структурной целостности продукта [161, 167, 182, 218].

Важной характеристикой процесса является скорость замораживания, которая определяется как скорость кристаллизации влаги от поверхности в глубину вещества. Проведение замораживания с различной скоростью влияет на размер и форму образующихся кристаллов, что определяет растворимость высушенного препарата [183, 187].

Очень быстрое замораживание, которое достигается погружением растворов в сжиженные газы или охлаждающую смесь, ведет к образованию большого числа очень мелких кристаллов. В основном такой способ применяется при замораживании плазмы, клеточных структур, где необходимо сохранение клеточной структуры, так как большие растущие кристаллы могут ее разрушить [10, 70, 113, 183, 186].

При производстве диагностических, липосомальных препаратов, гидролизатов, вакцин имеет место медленное замораживание, либо в отдельных холодových установках в течение (10 ± 8) ч при температурах от минус 30 °C до минус 80 °C и переносом замороженного препарата в вакуумную камеру сублимационной установки [97, 100, 109, 115, 117, 118, 217], либо в камере сублимационной установки, путем испарения влаги [12, 198, 212, 225].

2 этап. Первичная сушка (сублимация льда)

Стадия первичной сублимации или первичной сушки следует после замораживания материала и инициируется наличием вакуума в камере, при постепенном нагреве замороженного препарата в объёме, достаточном для сублимации льда, которая может происходить в том случае, когда парциальное давление паров в камере лиофильной установки будет ниже давления паров воды над продуктом [3, 67, 142, 162, 178].

Разность давлений может быть достигнута как путем повышения давления пара над поверхностью высушиваемого материала, так и путем снижения давления в окружающей среде посредством конденсации пара на охлаждающей поверхности, поглощения химическими веществами или непосредственного удаления в атмосферу за пределы сублимационной установки [134, 173, 178, 179].

Для оптимизации лиофилизации биоматериалов необходимо учитывать критические и температурные зоны для высушиваемого препарата. К ним относится температура коллапса, выше которой препарат, подвергнутый лиофилизации, теряет макроскопическую структуру и разрушается при высушивании. Если нагревание материала происходит при температуре, превышающей эвтектическую, существует риск вспенивания продукта из-за образования микрон переохлажденной жидкости, что ведет к снижению качества сухого продукта; температура первичной лиофилизации препарата должна быть всегда на несколько градусов ниже эвтектической [36, 57, 162].

Весь цикл удаления влаги сублимацией разделяется на три этапа. Первый этап характеризуется сублимацией с наружной поверхности. На втором этапе развивается зональная сублимация, поверхность фазового перехода начинает углубляться с разной скоростью. В итоге на некоторых участках зона сублимации смыкается с поверхностью теплоподвода. Третий этап отмечен локализацией замороженных фрагментов в общем слое уже высушенного материала, при этом скорость сублимации этих включений резко снижается. Завершением этапа сушки считается окончание сублимации всех фрагментов льда. Температура материала повышается до максимально допустимого уровня; остаточная, связанная влага удаляется испарением. Для снижения температуры сушки необходимо стремиться

поддерживать давление на самом низком уровне. Повышение скорости высушивания в значительной степени зависит от испарения влаги, разницы температур теплоносителя и самой температуры [5, 163, 173, 208]. Процесс сублимации льда представлен на рисунке 2.

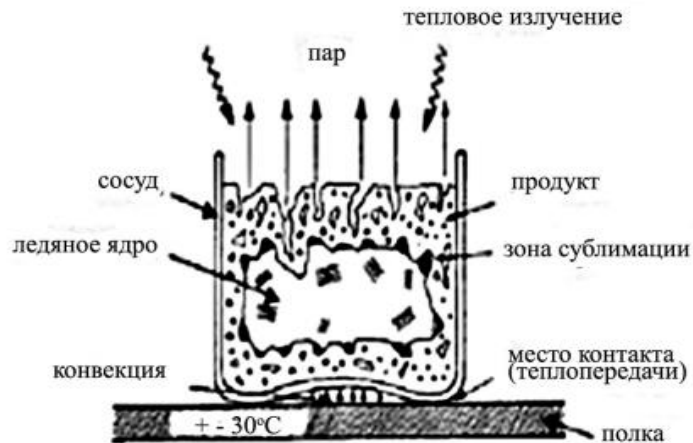


Рисунок 2 – Сублимация льда [89]

Полученный после сублимационной сушки материал имеет пористую структуру, поры формируются в местах, где раньше располагались кристаллы льда [77].

На завершающей стадии первичной сушки ведущим параметром является подбор оптимальной скорости нагрева лиофилизата. При низких показателях скорости нагрева и сублимации увеличиваются энергозатраты данного этапа, при высоких – повышается вероятность разрушения лиофилизата высокими значениями остаточной влаги. Следовательно, для перехода к этапу вторичной сушки необходимо постепенное медленное повышение температуры, коррелирующее с изменением скорости испарения остаточной влаги [125, 216].

Условия сублимации иммунобиологических препаратов на современном оборудовании отличаются от традиционных сублимационных установок возможностью использования режимов глубокого вакуума до 1 Па, а это на порядок выше, чем в сушках предыдущего поколения. Новые технологии позволяют значительно ускорить процесс. Однако при этом ускоренная сублимация несвязанной влаги вызывает значительное охлаждение препарата и

по окончании выхода этой влаги возникает резкий скачок на графике сушки препарата – температура начинает повышаться с большой скоростью, что приводит к значительному или полному снижению иммунологической активности высушенных препаратов. Избежать потери активности препарата можно лишь одним путем – снижением интенсивности сублимации. Для этого вакуум в камере установки необходимо уменьшить до 30-35 Па на первоначальном этапе сушки, пока температура не пройдет порог эвтектики. Далее вакуум можно постепенно увеличивать [125].

3 этап. Досушивание (удаление остаточной влаги)

Стадия десорбции или вторичная сушка начинается после сублимации льда и проходит при температуре выше нуля и более низком давлении для извлечения связанной влаги. Конечное содержание воды после первичного досушивания обычно составляет от 7 до 10 %, для биопрепаратов потеря в массе при досушивании должна содержать от 1 до 3 % [86]. При неправильном подборе условий, можно прийти к обратному плавлению. Это может произойти, если температура будет подниматься слишком быстро и лиофилизат недостаточно высушен при первичной сушке, в результате возможна деградация белков. Поэтому переход к вторичной сушке требует медленного повышения температуры лиофилизата, в котором полностью завершился процесс первичной сушки. Особенность данного этапа в том, что необходимо добиться определённых значений потери массы при досушивании лиофилизата (избежать эффекта пересушки, т.е. снижения допустимого содержания влаги ниже 1 %), при которых препарат сохраняет стабильность [11, 220].

Все лиофилизированные препараты обладают высокой гидрофильностью, поэтому их упаковка должна проводиться в помещении с влажностью не более 12-14 %, флаконы и бутылки должны укупориваться герметично, а ампулы желательно запаивать под вакуумом [89].

Таким образом, исходя из анализа научных работ отечественных и зарубежных авторов по лиофилизации препаратов, можно сделать вывод, что качество сухих диагностических препаратов зависит от подбора эффективных

сред высушивания, параметров лиофилизации: температуры замораживания продукта; конденсора; охлаждения и нагрева полок; вакуума; времени замораживания и лиофилизации. Среды высушивания и схемы лиофилизации подбираются и апробируются индивидуально к каждому конкретному препарату, так как это зависит от структуры препарата (белковая, липополисахаридная и т.д.); концентрации белка; эвтектической точки; объема и количества лиофилизируемого препарата; технических параметров лиофильной установки.

1.3 Менеджмент рисков при производстве и использовании препаратов

Производство медицинских изделий (МИ), применяемых в диагностических целях, подлежит обязательной государственной регистрации и должно соответствовать требованиям к внедрению, поддержанию и оценке системы управления качеством МИ [82]. Для внедрения системы управления качеством МИ необходимо выполнить ряд пунктов. Одним из них является разработка документированных требований к управлению рисками на всех этапах жизненного цикла медицинских изделий.

Биотехнология получения МИ для диагностики особо опасных инфекций *in vitro* сопряжена с использованием биологического сырья, что представляет существенный риск при их производстве и применении в лабораторной практике. Выявление и устранение ошибок на ранних этапах производства с помощью менеджмента риска (систематичная реализация процедур, тактики и практических способов управления риском), является неотъемлемой частью процессов обеспечения качества, гарантирующей безопасность конечного продукта [136, 137, 143].

Применение менеджмента риска регламентировано стандартом ГОСТ ISO 14971-2021 [29], который устанавливает процедуру определения опасностей, связанных с применением МИ (включая медицинские изделия для диагностики *in vitro* (МИ ИВД) для пользователей, а также процедуры управления рисками и мониторинга результативности данного управления [19, 29, 160]. Процесс менеджмента риска должен осуществляться производителями на

протяжении всего жизненного цикла МИ ИВД – от формулирования входных данных до постпроизводственного наблюдения за выпускаемыми МИ [14, 34].

В настоящее время работы по внедрению и поддержанию системы менеджмента качества, соответствующей требованиям ГОСТ ISO серии 9001 [28], ведутся в большинстве организаций. Однако для успешного функционирования в динамически развивающейся среде, организация должна стремиться к постоянному совершенствованию. Для повышения результативности и эффективности системы менеджмента качества (СМК) одновременно с процессным подходом необходимо внедрять и методы управления рисками, то есть применять риск-ориентированный процессный подход. Риск является неотъемлемой частью деятельности любой организации, вне зависимости от производимой продукции или оказываемых услуг, и влияет на цели организации. Главным преимуществом данной интеграции является постоянное улучшение процессов СМК путем заблаговременной идентификации «узких мест» процессов, что в дальнейшем позволит повысить удовлетворенность потребителей. Данное направление является на сегодняшний день весьма актуальным и практически востребованным в виду выхода стандарта ГОСТ Р ИСО 9001-2015 [28], в котором особое внимание уделено новому подходу «принятие решений, основанных на рисках» (или «риск-ориентированному мышлению»). В этой связи интеграция риск-ориентированного мышления в систему менеджмента качества является перспективным развитием организации. Документирование идентифицированных рисков позволит создать базу знаний о рисках и разрабатывать мероприятия по снижению уровня возможной реализации рисков. В современной литературе недостаточно внимания уделено вопросу управления рисками процессов СМК, риск-ориентированный подход не имеет должного научно-обоснованного методического и практического решения в отечественной и зарубежной литературе [130].

В научных публикациях по СМК рассматриваются методологические, организационные и технологические основы принятия управленческих решений в условиях риска, ключевые предпосылки возникновения рисков, дана их

классификация, рассмотрены основы теории управления рисками предприятия, описаны измерители и показатели производственных рисков, приводятся критерии выбора решений в условиях неопределенности [65, 74, 148].

Существует большое разнообразие научных статей по поводу понятия определения, сущности и природы риска. Это связано с многоаспектностью этого явления [15, 55, 68], риск – это следствие влияния неопределенности на достижение поставленных целей. Данный стандарт устанавливает ряд принципов, которые необходимо соблюдать, для того чтобы менеджмент риска был эффективным. Предугадать влияние всех факторов, особенно на практике, невозможно и нецелесообразно, однако их необходимо учитывать и предусматривать мероприятия, направленные на снижение их негативного воздействия или улучшение благоприятной тенденции [13].

Важным документом в инфраструктуре риск-менеджмента является план, определяющий подход, принципы, методы управления и ресурсы, задействованные в системе менеджмента риска. Такой план является отправной точкой в работе по управлению рисками. Документальное закрепление обеспечивает упорядоченность процессов и регламентирует процедуры и методы, применяемые в рамках управления рисками [59]. Общая схема проведения процесса представлена на рисунке 3.



Рисунок 3 – Этапы процесса управления рисками [14]

Процесс управления риском охватывает различные аспекты работы с риском, от идентификации и анализа риска до оценки его допустимости и

определения потенциальных возможностей снижения риска посредством выбора, реализации и контроля соответствующих управляющих действий [22, 129].

1 этап. Идентификация риска

На первом этапе составляется перечень всех потенциально опасных факторов (физических, химических, биологических и качественных). Источники опасности анализируются по следующим критериям: сырьё (определение опасных факторов, которые присутствуют в каждом из видов сырья); характеристики и нормы готовой продукции, заложенные в технических требованиях на конкретный вид продукции; помещения (опасные факторы, непосредственно связанные с расположением помещений (опасный фактор перекрёстного загрязнения во время перемещения сырья, полуфабрикатов, готовой продукции, или обусловленного движением персонала между различными участками) или внутренней окружающей средой, уборка помещений, дезинфекция и дератизация, необходимый уровень, гарантирующий отсутствие риска); оборудование; персонал; технологические процессы; упаковка и маркировка; хранение и реализация; использование готового продукта; отходы [44].

Идентификация опасностей производится на основании требований законодательных и регламентирующих органов, исходя из собранной и поддерживаемой предварительной информации и данных, рассмотренных выше, на опыте, внешней информации, включая научные публикации и работы. Так, например, состав вспомогательных веществ, размер частиц, растворимость, потеря в массе при высушивании препаратов могут повлиять на качество исследования, а значит, являются потенциальными рисками при проведении исследования и при неправильном анализе данных могут привести к отрицательным результатам при проведении исследования биоэквивалентности [1, 120].

При контроле растворимости препарата надо учитывать тот факт, что хорошо растворимые в воде действующие вещества быстрее высвобождаются из препаратов. Также нельзя отрицать тот факт, что на растворимость слабых кислот и оснований влияет рН среды [120].

Важным показателем для препаратов является потеря массы при высушивании. При разработке лиофилизированных или твердых лекарственных препаратов необходимо учитывать тот факт, что избыточная влажность гранулята может повлиять на распадаемость и скорость высвобождения, которые снизятся из-за увеличения прочности полученной твердой формы [120, 152].

Требуется индивидуальный подход к идентификации рисков и поддержанию мер по снижению рисков для всех классов МИ [132].

2 этап. Анализ и оценка риска

Для выбора оптимального варианта производства качественных диагностических препаратов с учетом возможных рисков требуется анализ рисков. От решений, принятых на ранних стадиях производства, в решающей степени зависит как стоимость производства, так и стоимость исправления неучтенных ошибок и отклонений. Учитывая специфику отрасли, которая производит препараты, оказывающие влияние на здоровье потребителя, можно выделить особую роль риск-менеджмента именно в ней, так как цена ошибки очень высока [56].

Современная теория управления рисками располагает целым арсеналом количественных методов и методик оценки и анализа рисков. В частности, методическим аспектам оценки рисков посвящены исследования Гончарова Д.С. [21], Беликова А.Ю. и Давыдовой Г.В. [38], Ермасовой Н.Б. [47], Коршуновой Л.Н. и Продановой Н.А. [60], Токаренко Г.С. [139], Уродовских В.Н. [149], Родионовой М.А. [128] и других ученых.

В подавляющем большинстве работ, посвященных вопросам оценки и анализа рисков, как самостоятельные группы рассматриваются статистические (математико-статистические, вероятностные), экспертные (эвристические), аналитические (расчетно-аналитические) и другие [37, 47, 60, 150, 154].

Уже в рамках каждой группы методов (универсальных подходов к исследованию рисков, применимых вне зависимости от их предметного содержания, специфики сферы и ситуации) следует выделять конкретные способы и методики, адаптированные для тех или иных экономических условий и видов

деятельности. Причем часть таких методик может носить узкий специализированный характер, а часть – претендовать на большую или меньшую общность, универсальность применения, приближаясь тем самым к методам анализа [91].

Статистические методы основываются на изучении статистики потерь и выигрышей, имевших место в аналогичных производственно-хозяйственных ситуациях, установлении частоты и вероятности появления определенных типов рисков событий. Статистические методы обеспечивают наиболее точную оценку степени риска, но применимы при наличии достаточно полной и достоверной информации. Степень универсализма статистических методов высока. Оценка риска по статистическим показателям часто дополняет экспертные или невероятностные математические оценки. К сожалению, эти методы не могут найти широкого применения в анализе риска некоторых операций предприятий реальной сферы, поскольку они слабо поддаются стандартизации, и оценка вероятности рисков событий представляет серьезную проблему [91].

Экспертные методы предполагают сбор, изучение, согласование и обобщение оценок риска, вынесенных высококвалифицированными специалистами в данной предметной области в процессе индивидуальной или коллективной работы [128].

Безусловным преимуществом экспертных методов является возможность их использования практически в любых сферах, ситуациях и условиях. Однако это утверждение относится именно к получению экспертного мнения как универсальному методу. Конкретные методики экспертной оценки специфичны, совершенно различны по содержанию, для анализа риска конкретной ситуации во многих случаях требуется разработка полностью оригинальной методики. Привлечение экспертов должного уровня квалификации и проведение процедуры оценки может потребовать существенных затрат ресурсов и времени. Эти обстоятельства, а, кроме того, неизбежный субъективизм, следует признать недостатками экспертных методов [91].

Расчетно-аналитические методы позволяют количественно оценить риски при отсутствии достаточно обширной базы статистических данных. Все методы данной группы являются математическими, некоторая их часть основывается на функциональных связях между показателями и, следовательно, применима в ситуации, близкой к полной определенности [91].

Результатом оценки каждого риска является документально подтвержденное решение о его приемлемости или неприемлемости. Если риск признается приемлемым, составляется обоснованный отчет. Для неприемлемых рисков создается план уменьшения рисков [160]. Все риски, проанализированные при составлении плана, проходят необходимую оценку и должны быть минимизированы [58].

Для визуального воспроизведения выделенных рисков, применительно к МИ ИВД, целесообразно использовать «Матрицу последствий и вероятностей». Входными данными к процессу являются шкалы опасности и вероятности, установленные в соответствии с выделенными рисками. Уровень опасности и вероятность возникновения каждого опасного фактора оценивается по 5-ти бальной шкале. В соответствии со шкалами выставляются экспертные оценки определения приемлемости или неприемлемости рисков [137].

Количественную оценку несоответствий проводят на основе вычисления коэффициента риска по методике Трохимчука В.В. с соавт. [144] с учетом уровня вероятности возникновения риска и уровня опасности при возникновении риска.

3 этап. Принятие решения по риску

В научных публикациях представлены основные точки зрения и подходы к проблеме управления рисками. Рассмотрены методология, общие положения, концепции, а также понятийный аппарат. Приведены основные фазы, этапы, шаги и процедуры, применяемые в управлении рисками [14, 59].

Методы риск-менеджмента представляют собой направленные действия по снижению степени существующих угроз и возможных убытков [74, 177, 201]. Таким образом, цель снижения рисков состоит из трех стратегий, представленных на рисунке 4.

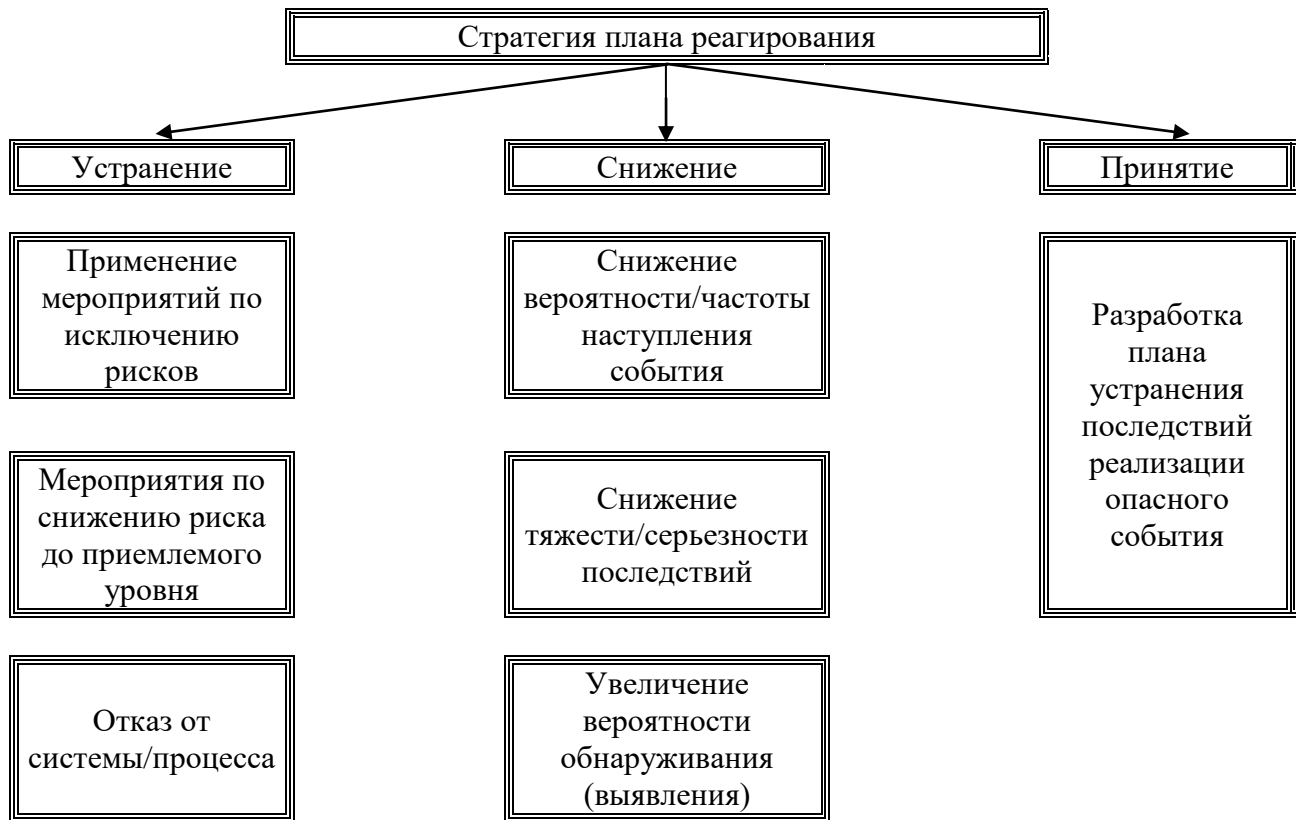


Рисунок 4 – Стратегия плана реагирования [14]

Для управления разрабатывают корректирующие действия по каждому риску, внедрение которых позволит сократить риск путем проведения междуоперационных контролей и контролей параметров при выходе конечного продукта из процесса производства и перевести его из категории значимого (при наличии) в категорию допустимого или приемлемого [14].

Цель и задача анализа рисков при управлении системой качества может возникнуть для расстановки приоритетов в развитии этой системы или устранении недостатков, т.е. что необходимо делать в первую очередь, а что – потом. Другие частные цели, такие как принятие решения или выбор критических параметров, могут ставиться при выполнении или проведении отдельных мероприятий – валидация, выбор поставщика, принятие решения в случае отклонений от качества и т.д. Как правило, последние две цели, т.е. анализ рисков для определения оптимального использования ресурсов и страхование риска требуют количественной оценки [56].

План управления рисками описывает, как организовано управление рисками проекта и как оно выполняется на практике. При составлении данного документа проводится поиск возможных рисков, их оценка, определяются меры по контролю над выявленными рисками, разрабатываются меры по их снижению и способы контроля над эффективностью принятых мер [120, 189, 193].

В российских стандартах отсутствует закрепленная и общеприемлемая методология по управлению рисками в организациях [14, 59].

4 этап. Информирование о риске

Информирование о риске представляет собой обмен информацией по рискам и управлением рисков между лицами, принимающими решения и сотрудниками производства, что, в свою очередь, позволяет осуществить контроль на всех стадиях производства [14, 27]. Включенные сведения могут касаться существования, характера, формы, вероятности, тяжести, приемлемости, контроля, рассмотрения, способности к выявлению и других аспектов рисков для качества [127].

5 этап. Мониторинг

Является одним из важных этапов для эффективной реализации действий, запланированных на предыдущих этапах. Мониторинг направлен на контроль за идентификацией рисков, определение остаточных рисков, обеспечение выполнения плана рисков и оценивания его эффективности с учетом понижения риска. Результаты мониторинга и пересмотра рисков должны быть частью системы измерения эффективности деятельности [27].

Из проведенного анализа научной литературы и нормативных документов по менеджменту рисков следует, что управление рисками должно быть постоянно действующей частью процесса управления качеством на производстве МИ, при этом анализ риска должен проводиться как периодически через установленные производителем промежутки времени (как правило, ежегодно), так и внепланово – в случае возникновения негативных событий, связанных с изделием производителя и/или аналогичными изделиями других производителей, которые находятся в обращении. При выявлении в процессе постпроизводственного

наблюдения (после получения регистрационного удостоверения (РУ) новых, ранее не идентифицированных рисков, или получения новых данных об увеличенном уровне идентифицированных ранее рисков, производители должны провести повторный анализ рисков, разработать и реализовать план мероприятий по снижению рисков до приемлемого уровня [17]. От управления рисками зависит национальная безопасность государства в плане обеспечения иммунобиологическими и лекарственными препаратами, а также поддержания достойного уровня охраны здоровья граждан.

Отечественными и зарубежными авторами изучены различные аспекты управления рисками в целом и управления рисками для качества в частности. Но в настоящее время данная проблематика в области диагностических препаратов изучена недостаточно.

Таким образом, для достоверной индикации патогенов, диагностики инфекционных заболеваний необходимо проводить исследования с использованием различных иммунохимических анализов. Многие реакции сложные и громоздкие, а методы их постановки малорезультативны. В диагностике заболеваний инфекционной патологии важное место занимают качественные диагностические системы, сочетающие в себе высокую чувствительность, специфичность, информативность и простоту выполнения исследования. Эти важные свойства характерны для реакции непрямой гемагглютинации, однако используемые диагностикумы в основном производят в жидкой форме, тем самым снижая стабильность препаратов при хранении и транспортировке, а также для постановки анализа требуются дополнительные ингредиенты. В связи этим, особую актуальность приобретают поиски перспективных методов стабилизации диагностикумов путем подбора компонентов сред и режимов лиофилизации, проведение менеджмента риска препаратов для улучшения их качества, разработка и контроль экспериментально-производственных диагностических наборов со всеми необходимыми ингредиентами.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы

2.1.1 Штаммы микроорганизмов

В работе использованы штаммы микроорганизмов, характеристики которых представлены в таблице 1. Штаммы получали из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. Штаммы микроорганизмов обладали типичными культуральными, морфологическими, тинкториальными и другими биологическими свойствами.

При работе со штаммами II-IV групп патогенности руководствовались санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» [133].

2.1.2 Препараты

Коммерческие препараты:

- набор реагентов Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный жидкий «РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ» – № ФСР 2011/10270 (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия);
- набор реагентов Тест-система иммуноферментная магноиммуносорбентная для выявления возбудителя туляремии «ИФА-МИС-Тул-СтавНИПЧИ» – № РЗН 2013/429 (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия);
- сыворотка диагностическая туляремийная сухая для реакции агглютинации (РА) – № ФСР 2011/10029 (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия);
- сыворотка диагностическая поливалентная бруцеллёзная сухая для реакции агглютинации (РА) – № ФСР 2012/13323 (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия);

Таблица 1 – Характеристика штаммов микроорганизмов, использованных в работе

№	Наименование микроорганизмов и обозначение штамма	Характеристика штаммов		
		морфологические и тинкториальные свойства	культуральные свойства	биохимические свойства
1	2	3	4	5
1-16	<p><i>Francisella tularensis</i> 55, <i>Francisella tularensis</i> Miura, <i>Francisella tularensis</i> Schu, <i>Francisella tularensis</i> 15 НИИЭГ, <i>Francisella tularensis</i> holarctica biovar II, ery R (с-3) 144/713, <i>Francisella tularensis</i> holarctica biovar II, ery R (с-52) 7, <i>Francisella tularensis</i> holarctica biovar II, ery R (с-7) 296/19, <i>Francisella tularensis</i> holarctica biovar II, ery R (с-72) 21, <i>Francisella tularensis</i> holarctica biovar I, ery S (с-81) 124, <i>Francisella tularensis</i> holarctica biovar II, ery R (с-106) 202, <i>Francisella tularensis</i> holarctica biovar I, ery S (с-9) 298/31, <i>Francisella tularensis</i> holarctica biovar II, ery R 30, <i>Francisella tularensis</i> holarctica biovar II, ery R 114, <i>Francisella tularensis</i> holarctica biovar II, ery R 115, <i>Francisella tularensis</i> holarctica biovar II, ery R (с-116) 7, <i>Francisella tularensis</i> holarctica biovar II, ery R 137</p>	<p>Грамотрицательные коккобактерии размером 0,3-0,5 мкм. Неподвижные, спор не образуют. Могут образовать нестойкую капсулу в живом организме.</p>	<p>Аэробы. На глюкозо-цистеиновом агаре рН 7,2-7,4 при обильном посеве через 2 сут инкубации при температуре (37±1) °С культуры дают пышный сливающийся серовато-голубоватого оттенка, умеренно блестящий слизистый рост. В жидкой глюкозо-цистеиновой среде растут в виде пленки при равномерном помутнении среды. Рост на Ft-агаре типичный, в виде извилистого, слегка блестящего налета. Колонии беловато-серого цвета, мелкие, с ровными краями. На простых средах: мясо-пептонном агаре (МПА) и мясо-пептонном бульоне (МПБ) рост отсутствует.</p>	<p>Ферментируют с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу. Не образуют индола. Белки ферментируют с образованием сероводорода. Устойчив к эритромицину.</p>

1	2	3	4	5
17	<i>Brucella melitensis</i> Rev-1	<p>Мелкие коккобактерии, величиной 0,3-0,5 мкм. Неподвижны, не образуют спор. Красятя всеми анилиновыми красками, грамотрицательные.</p>	<p>Строгие аэробы. Наилучшая питательная среда – печеночный бульон или агар. Для бруцелл характерен медленный рост первых поколений (от 20 до 30-35 дней). Лабораторные культуры вырастают через 2 сут. На агаре при рН среды 6,6-7,4 и температуре (37±1) °С образуют круглые, выпуклые, гладкие, блестящие, гомогенные или нежнозернистые колонии. На бульоне – помутнение. Не лизируются бактериофагом ТБ.</p>	<p>Желатины не разжижают, не образуют сероводород, не свертывают молоко, не расщепляют углеводов. Тионин и основной фуксин 1:25 000 не оказывают бактериостатического действия. Индол не образуют. Нитраты не редуцируют. Мочевина редуцируется до аммиака.</p>
18	<i>Brucella abortus</i> 19ВА	<p>Мелкие коккобактерии, величиной 0,3-0,5 мкм. Неподвижны, не образуют спор. Красятя всеми анилиновыми красками, грамотрицательные.</p>	<p>Первые поколения требуют повышенного содержания в атмосфере СО₂. При последующих пересевах СО₂ – зависимость теряется. В остальном культуральные свойства аналогичны <i>B. melitensis</i>.</p>	<p>Не разжижают желатину, не образуют индола, не свертывают молоко, не расщепляют углеводов, ферментируют белки с образованием аммиака и сероводорода. Основной фуксин 1:25 000 не задерживает роста; тионин 1:25 000 действует бактериостатически. Мочевина и аспарагин редуцируются до аммиака.</p>

1	2	3	4	5
19	<i>Brucella suis</i> 61	Мелкие коккобактерии, величиной 0,3-0,5 мкм. Неподвижны, не образуют спор. Красятся всеми анилиновыми красками, грамотрицательные.	Строгие аэробы. На агаре и бульоне на 2-3 сут дают типичный для бруцелл рост. Не лизируются бактериофагом ТБ.	Биохимическая активность незначительна. Не образуют индола, не разжижают желатину, не свертывают молоко. Тионин 1:25 000 не оказывает влияния на рост м.к., основной фуксин 1:25 000 действует бактериостатически.
20-22	<i>Yersinia enterocolitica</i> 64, <i>Yersinia enterocolitica</i> 178, <i>Yersinia enterocolitica</i> 383	Грамотрицательные кокковидные палочки.	Через 24 ч роста на плотных питательных средах при температуре (24±1) °С образуют мелкие колонии, которые увеличиваются в размерах через 2 сут.	Ферментируют арабинозу, сорбит, арабитол, арбутин, ксилозу; сероводород не образуют.
23	<i>Salmonella typhimurium</i> 9640	Небольшие грамотрицательные палочки. Подвижны, имеют перитрихальные жгутики. Не кислотоустойчивы. Спор и капсул не образуют.	Факультативные анаэробы. Хорошо растут на средах с мясным экстрактом при температуре (37±1) °С (рН 7,2). На средах Плоскирева, Левина и Эндо – колонии прозрачные, бесцветные или голубоватые; на висмут-сульфитной среде колонии черные со светлым ободком, блестящие.	Желатины не разжижают, индол не образуют, нитраты не редуцируются, продуцируют сероводород. Молоко не свертывают. Ферментируют с образованием кислоты и газа глюкозу, левулозу, галактозу, арабинозу, мальтозу, декстрин, маннит, сорбит, инозит. Ферментируют с образованием кислоты глицерин.

1	2	3	4	5
24	<i>Escherichia coli</i> 118	<p>Прямые палочковидные бактерии, размером 1,1-1,5×2,0-6,0 мкм. Располагаются в мазках поодиночке или парами. Имеется капсула, подвижны (перитрихии), спор не образуют. Грамотрицательные.</p>	<p>Факультативные аэробы. Температура роста (37±1) °С. На МПА растут в виде слабо выпуклых сероватых колоний, в бульоне вызывают диффузное помутнение с образованием осадка.</p>	<p>Желатины не разжижают, нитраты редуцируются в нитриты, образуют индол. Молоко свертывают. Ферментируют с образованием кислоты и газа глюкозу, левулозу, галактозу, арабинозу, лактозу, мальтозу, раффинозу, декстрин, манит, салицин и сорбит.</p>

- сыворотка диагностическая холерная О1 адсорбированная сухая для реакции агглютинации (РА) – № ФСР 2007/00468 (ФКУН Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Россия);

- набор реагентов «Сыворотки диагностические сальмонеллёзные адсорбированные О-поливалентные для реакции агглютинации» – № РЗН 2017/5914 (ЗАО «ЭКОлаб», Россия);

- набор реагентов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие антивидовые против иммуноглобулинов человека и различных животных (лошади, барана, быка, козы, свиньи, кролика, крысы, морской свинки, мыши, собаки) сухие» – № ФСР 2008/03731 (ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» Минздрава, Россия);

- набор реагентов «Диагностикум туляремийный жидкий для объемной и кровянокапельной реакции агглютинации» – № ФСР 2008/03073 (АО НПО «Микроген», Россия);

- SERION ELISA classic *Francisella tularensis* IgG (Реагент для определения антител IgG к возбудителю туляремии) – № ФСЗ 2012/12631 («Институт Вирион\Серион ГмбХ», Германия);

- набор реагентов для выявления ДНК *Francisella tularensis* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Francisella tularensis* – РГФ) – № ФСР 2011/12107 (ФКУН Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Россия).

2.1.3 Экспериментальные сыворотки

В работе использовали экспериментальные гипериммунные туляремийные сыворотки кроликов (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора):

- сыворотки №№ 30, 31, 32, 33 от 2017 г.;
- сыворотка №№ 34, 35, 36, 37 от 2018 г.;
- сыворотки №№ 38, 39, 40, 41, 42 от 2019 г.

2.1.4 Полевой материал

Для определения диагностической ценности набора реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый сухой» («ДЭТ-Иг») исследовали пробы из объектов окружающей среды, взятые из природных очагов туляремии Ставропольского края:

- 10 проб (экскременты мышевидных грызунов, погадки хищных птиц), отобранные в период проведения эпизоотологического обследования Петровского района Ставропольского края с 14 по 15 января 2020 г.;

- 10 проб (помет хищных млекопитающих, мумифицированный труп полевки), отобранные в период проведения эпизоотологического обследования Кировского и Минераловодского районов Ставропольского края с 27 по 30 марта 2020 г.;

- 33 пробы (экскременты мышевидных грызунов и зайцев, погадки хищных птиц), отобранные в период проведения эпизоотологического обследования Кировского, Советского, Георгиевского районов Ставропольского края с 21 по 31 июля 2020 г.;

- 11 проб (смывы с грудной полости, органы павших животных), отобранные в период проведения эпизоотологического обследования Шпаковского района Ставропольского края с 21 по 29 марта 2022 г.;

- 3 пробы (органы павших животных), отобранные в период проведения эпизоотологического обследования Шпаковского района Ставропольского края с 25 по 28 октября 2022 г.;

- 2 пробы (вода), отобранные в период проведения эпизоотологического обследования Петровского района Ставропольского края с 11 по 12 ноября 2022 г. (во время вспышки туляремии);

- 4 пробы (смывы с грудной полости, органы павших животных), отобранные в период проведения эпизоотологического обследования Петровского района Ставропольского края с 11 по 12 ноября 2022 г. (во время вспышки туляремии).

Сбор полевого материала проводился сотрудниками лаборатории медицинской зоологии ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

2.1.5 Клинический материал

Для определения диагностической ценности набора реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный сухой» («ДЭТ-Аг») использовали клинический материал (сыворотки крови):

- людей, не болевших ранее туляремией и не вакцинированных против неё (сотрудники ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора) – 20 образцов;
- людей, вакцинированных против туляремии (сотрудники ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора) – 22 образца;
- людей больных туляремией (выявленные в результате вспышки туляремии в Петровском районе Ставропольского края в 2022 г.) – 7 образцов.

Все обследуемые давали информированное согласие на проведение настоящих исследований (согласно Федеральному закону «Об основах охраны здоровья граждан в РФ» от 21.11.2011 № 323-ФЗ) [83].

Материал предоставлен сотрудниками лаборатории диагностики бактериальных инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

2.1.6 Реактивы, сырье

При выполнении работы были использованы следующие реактивы и сырье:

- агар Альбими (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия);
- агар «Дифко» («Дифко», США);
- агар микробиологический (ГОСТ 17206-96);
- агар Хоттингера (ТУ 9385-0004-01897080-2009);
- азид натрия (Helicon, Россия);
- бычий сывороточный альбумин («Диаэм», Россия);
- вода дистиллированная (ГОСТ Р 58144-2018);

- водорода перекись (ГОСТ 177-88);
- декстран (ApplChem, Германия);
- желатин (ГОСТ 23058-89);
- кислота каприловая (октановая) (Merk Schuchardt OHG, Германия);
- лактоза (ГОСТ 33567-2015);
- масло иммерсионное «Кедровое» (ГОСТ 13739-78);
- натрия алкилсульфат вторичный (ТУ 6-01-576-3450-102-90);
- натрий углекислый (ГОСТ 83-79);
- натрия хлорид (ГОСТ 4233-77);
- натрия гидроокись (ГОСТ 4328-77);
- поливинилпирролидон (ТУ 9365-002-46270704-2001);
- полиглюкин (РУ № ЛСР-000604/08 от 2008-02-12);
- реополиглюкин (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь);
- сахароза (ГОСТ 5833-75);
- соляная кислота (ГОСТ 3118-77);
- спирт этиловый «Экстра» (ГОСТ 55878-2013);
- твин 80 (Sigma-Aldrich, США);
- тиомочевина (ГОСТ 6344-73);
- трегалоза 100 % (Swanson, США);
- формалин в/с (ГОСТ 1625-2016);
- хлороформ в/с (ГОСТ 20015-88);
- Ft-агар (ТУ 9398-028-78095326-2007).

2.1.7 Расходные материалы

Для выполнения работы использованы:

- ампулы ШПВ-6, НС-1 (ГОСТ 34038-2016);
- вата медицинская (ГОСТ 5556-81);
- колпачки алюминиевые (ГОСТ Р 51314-99);
- марля медицинская (ГОСТ 9412-2021);
- пипетки градуированные (ГОСТ 29227-91);

- планшет полимерный для иммунологических реакций круглодонный – 96 лунок (ТУ 9398-057-00480230-2009);
- пластина с луночками для серологических реакций – 72 лунки (ТУ 10-23-331-95);
- предметные стекла (ГОСТ 9284-75);
- пробирки биологические (ГОСТ 25336-82);
- пробки резиновые (ТУ 9398-019-00152164-2004);
- стеклошарики диаметр 5 мм (Sigmund Lindner GmbH, Германия);
- стеклянные флаконы ФГГ-5 (ТУ 23.13.11-001-90126176-2018);
- цилиндры мерные (ГОСТ 1770-74);
- чашки Петри (ГОСТ 23932-90).

2.1.8 Оборудование

- автоматический счетчик клеток TC20 (Bio-Rad, США);
- автоматическая цифровая система для подготовки виртуальных препаратов и морфологического анализа в флуоресцентной микроскопии Vision Epi («West Medica Produktions and Handels-GmbH», Франция-Австрия);
- баня термостатирующая прецизионная ТЖ-ТБ-12 (ООО «ГлавКомплект-Гео», Россия);
- весы технические ALC 2100 d2 (ACCULAB, США);
- весы лабораторные электронные «Pioneer» (OHAUS, КНР);
- микроскоп биологический «Meiji Techno MT6000» (Meiji Techno, Япония);
- микроскоп люминесцентный прямой «ZEISS Primo Star» (ZEISS, Германия);
- морозильный ларь EL 21 SLT, (EiCold, Дания);
- настольный орбитальный шейкер с открытым типом платформы MaxQ2000 (Thermo Scientific, США);
- pH-метр PB-11 «Sartorius» (Sartorius, Германия);
- рентгеновский микротомограф Skyscan 1176 (S/N 13F08078, Bruker-microCT, Бельгия);
- спектрофотометр UV-1800 (SHIMADZU, Япония);

- термостат электрический суховоздушный ТС-1/20 (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия);
- холодильник LCv 4010-24B-001 (Liebherr, Австрия);
- лиофильная сушка Alpha 2-4 LSCplus (Martin Christ, Германия);
- центрифуга SIGMA 6-K15 (Sigma Laborzentrifugen, Германия);
- шкаф сушильный вакуумный ШСВ-45к (ОАО «Казанский завод медицинской аппаратуры», Россия);
- ультразвуковой гомогенизатор Q125 «Sonicator» (QSONICA, США);
- ультрацентрифуга лабораторная TreeWe 21SR (3W, Китай).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Получение и контроль формализированных эритроцитов

Кровь у барана брали из яремной вены, предварительно обработав шейную область спиртом, в бутылки со стеклянными бусинками, перемешивали в течение (15 ± 5) мин, извлекали фибрин и дефибринированную кровь сливали в стеклянную бутылку. Кровь фильтровали через два слоя марли в чистую бутылку, после чего осаждали центрифугированием в течение (15 ± 5) мин при 2000 g в 0,9 % растворе натрия хлорида. Супернатант осторожно сливали, а осадок эритроцитов трехкратно промывали 0,9 % раствором натрия хлорида. Расчет необходимого количества формалина проводили по формуле (1):

$$X = \frac{Y \times 3}{C} \quad (1)$$

где X – необходимое количество формалина в мл для формализации эритроцитов;

Y – объем осадка отмытых эритроцитов;

C – процент формальдегида в используемом растворе формалина.

К полученному объему эритроцитов добавляли равный объем 0,9 % раствора натрия хлорида, подогретого до температуры (37 ± 1) °C с рассчитанным количеством раствора формалина, и помещали на орбитальный шейкер при умеренном встряхивании на 16-18 ч при температуре (22 ± 2) °C. По

окончании формализации эритроциты осаждали центрифугированием и четырежды отмывали 10-кратным объемом 0,9 % раствора натрия хлорида (10 мин при 2000 g). После чего доводили объем эритроцитов 0,9 % раствором натрия хлорида до первоначального и добавляли в качестве консерванта формалин до 1 %. Полученные эритроциты хранили в холодильнике при температуре (5 ± 3) °C 1 год без изменения свойств в течение указанного срока наблюдения.

Гомогенность формализированных эритроцитов контролировали следующим образом: 1 каплю 0,5 % взвеси эритроцитов наносили на предметное стекло, покрывали покровным стеклом и просматривали при малом увеличении микроскопа ($\times 10$). Эритроциты должны лежать изолированно, допускается 2-3 скопления, содержащие не более 10 эритроцитов в 10 полях зрения.

Контроль отсутствия склонности к спонтанному склеиванию осуществляли следующим образом: к 0,4 мл стабилизатора твин 80 в разведении 1:50000 в планшет серологический добавляли 0,05 мл 2,5 % взвеси эритроцитов, гомогенизировали и оставляли при температуре (22 ± 2) °C на $(2,5\pm 0,5)$ ч. Эритроциты должны выпадать в осадок в виде «пуговки» или небольшого колечка с ровным краем. В случае образования спонтанной агглютинации данная серия эритроцитов выбраковывается.

Концентрацию эритроцитов определяли следующим образом: эритроциты разбавляли до 2,5 % концентрации 0,9 % раствором натрия хлорида. После получения гомогенной взвеси 2,5 % эритроциты дополнительно разводили в 40 раз и перемешивали. Учет проводили на автоматическом счетчике клеток ТС 20 (Bio-Rad, США).

2.2.2 Получение водорастворимого антигена

Водорастворимый антиген туляремийного микроба получали водно-солевой экстракцией и дезинтеграцией по методу Н.Ф. Василенко [94] для иммунизации и сенсibilизации эритроцитов.

2.2.3 Получение гипериммунных сывороток и выделение иммуноглобулинов

Гипериммунные туляремиальные сыворотки, полученные по схеме И.С. Тюменцевой [145], использовали для сенсибилизации эритроцитов после выделения из них иммуноглобулинов каприловым методом по G. Steibuch и R. Andran [215] и контроля аналитической чувствительности.

Кровь для исследования брали из сердца или сонной артерии у кроликов. Взятие крови в объеме 80-100 мл осуществляли с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕС), и одобренных Комитетом по биомедицинской этике НИИ физиологии СО РАМН. Кровь от каждого животного вносили в стерильные флаконы и оставляли при температуре (22 ± 2) °С на (60 ± 10) мин для образования сгустка, затем пастеровской пипеткой проводили отделение сгустка от стенок сосуда. Свернувшуюся кровь помещали в холодильник при температуре (5 ± 3) °С на (18 ± 2) ч для ретракции сгустка.

2.2.4 Методы контроля антигена и иммуноглобулинов

Постановку реакции иммунодиффузии (РИД) проводили для контроля активности антигенов и сывороток по O. Ouchterlony [200] в чашках Петри в 1 % агаровом геле (Difco, USA).

Контроль иммуноглобулинов проводили в реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) по Т. Н. Weller, А. Н. Coons [221]. Микроскопию препаратов осуществляли в падающем отраженном свете в люминесцентном микроскопе «ZEISS Primo Star» (ZEISS, Германия). За положительный результат принимали яркую (4+, 3+) флуоресценцию периферии микробных клеток с четкой морфологией.

Количественное определение белка проводили на спектрофотометре UV-1800 (SHIMADZU, Япония) при длине волны 280 нм по ОФС.1.2.3.0012.15 [87].

2.2.5 Сенсibilизация эритроцитов

Для сенсibilизации 20 % взвеси формализированных эритроцитов барана использовали туляремийные иммуноглобулины, согласно методике описанной в патенте РФ № 2747420 [116], получая диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый жидкий.

Для диагностикума эритроцитарного туляремийного антигенного жидкого сенсibilизацию 20 % взвеси формализированных эритроцитов барана проводили водорастворимым туляремийным антигеном, после активации поверхностно-активным веществом (ПАВ).

2.2.6 Лиофилизация биологического материала

Готовые препараты разливали во флаконы и ампулы, замораживали в морозильном ларе EL 21 SLT (ElCold, Дания) при температуре минус (40 ± 2) °C не менее 18 ч. Лиофилизацию проводили с помощью лиофильной установки камерного типа Alpha 2-4 (Martin Christ, Германия) под вакуумом.

2.2.7 Контроль лиофилизированных эритроцитарных препаратов

Лиофилизированные диагностикумы и 50 % формализированные эритроциты барана контролировали:

- по физико-химическим показателям

Внешний вид, растворимость, цветность определяли визуально, согласно ГОСТ Р 51352-2013 [22] и ОФС.1.4.1.0031.18 [88].

Определение потери в массе при высушивании проводили весовым методом, описанным в ОФС 1.2.1.0010.15 [86]. Для контроля использовали содержимое ампул в количестве 0,15-0,20 г. Потеря в массе при высушивании не должна превышать 3 %.

Морфологию исследовали на автоматической цифровой системе для подготовки виртуальных препаратов и морфологического анализа в флуоресцентной микроскопии Vision Epi («West Medica Produktions and Handels-GmbH», Франция-Австрия), окрашивая препарат флуоресцентным красителем. Эритроциты барана должны иметь округлую форму и средний размер 3,9 мкм.

Параметры сканирования на рентгеновском микротомографе Skyscan 1176

(S/N 13F08078, Bruker-microCT, Бельгия) проводили в программе Skyscan 1176 control program (10.0.0.0, Bruker-microCT, Бельгия): X-ray voltage 40 kV, X-ray current 600 μ A, no filter, image pixel size 8,87 μ m, rotation step 0,3°, frame averaging 4.

Сканированный объект реконструировался в программе Nrecon (1.7.4.2, Bruker-microCT, Бельгия) со следующими основными параметрами реконструкции: ring reduction – 10, beam hardening - 0.

Ориентация в пространстве (x, y, z) и выделение отдельных областей реконструированных материалов проводились в программе DataViewer (1.5.6.2, Bruker-microCT, Бельгия).

Визуализация, анализ данных и получение 3D моделей проводились в программах CT-analyser (1.18.4.0, Bruker-microCT, Бельгия) и CTvox (3.3.0r1403, Bruker-microCT, Бельгия) [194, 203].

Для определения рентгеновской плотности проб, их сканирование проводилось вместе с пробиркой воды имеющими диаметр, соответствующий толщине исследуемой пробы.

Научно-исследовательская работа выполнялась на базе межкафедральной научно-образовательной лаборатории экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии Медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет».

- по иммунобиологическим показателям

Постановку РНГА и реакции торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА) проводили макро- и микрометодами по методике А.К. Кравченко и М.И. Соколова [69, 190].

Аналитическую чувствительность и аналитическую специфичность диагностикума определяли согласно ГОСТ 53022.2-2008 [24].

Диагностическую ценность определяли по ГОСТ 53022.3-2008 [25].

2.2.8 Методы определения стабильности

Срок годности и условия хранения устанавливали в ходе изучения стабильности препарата для диагностики *in vitro* в масштабе реального времени

(*shelf life*) и методом «ускоренного старения» в соответствии с ГОСТ Р ИСО 23640-2015 [26] и ОФС 1.1.0009.18 [85].

Долгосрочные испытания проводились в рекомендованной для данного МИ ИВД первичной и вторичной упаковке при постоянной верхней (наиболее высокой) температуре установленного режима хранения.

При использовании метода «ускоренного старения» образцы выдерживали при температурах, превышающих температуру его хранения в процессе обращения. При этом, температура экспериментального хранения (t_3) должна превышать температуру хранения (t_{xp}) не менее чем на 10 °С. Сроки экспериментального хранения в зависимости от температурного интервала рассчитывали в соответствии с ОФС 1.1.0009.18 [85].

Сроки годности (С) рассчитывали по формуле зависимости Вант-Гоффа (2):

$$C = K \times C_3 \quad (2)$$

где К – коэффициент соответствия;

C_3 – экспериментальный срок годности, сут.

Коэффициент соответствия (К) рассчитывали по формуле (3):

$$K = A \frac{t_3 - t_{xp}}{10} \quad (3)$$

где t_{xp} – температура хранения;

t_3 – температура экспериментального хранения;

А – температурный коэффициент скорости химической реакции (принят равным 2,5).

2.2.9 Менеджмент риска

Проводили в рамках научных исследований в соответствии с требованиями ГОСТ ISO 14971-2021 [29] с использованием стандартизованного метода анализа видов и последствий потенциальных отказов (FMEA) [159, 160].

Количественную оценку рисков проводили на основе вычисления коэффициента риска по формуле (4) [144]:

$$K_r = S \times P \quad (4)$$

где K_r – коэффициент риска;
 S – уровень опасности возникновения риска;
 P – уровень вероятности возникновения риска.

В зависимости от величины K_r определяли категорию риска:

$K_r \leq 4$ – риск приемлемый, корректирующих мероприятий не требуется;
 $5 \leq K_r \leq 9$ – риск допустимый, решение о проведении корректирующих мероприятий принимается в каждом конкретном случае;
 $K_r \geq 10$ – риск значимый, корректирующие мероприятия необходимы.

2.2.10 Статистический анализ

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 $p < 0,05$.

Чувствительность, специфичность и точность рассчитывали по следующим формулам (5), (6), (7):

$$\text{Чувствительность} = \frac{\text{ИП}}{(\text{ИП} + \text{ЛО})} \quad (5)$$

$$\text{Специфичность} = \frac{\text{ИО}}{(\text{ИО} + \text{ЛП})} \quad (6)$$

$$\text{Точность} = \frac{(\text{ИП} + \text{ИО})}{(\text{ИП} + \text{ИО} + \text{ЛП} + \text{ЛО})} \quad (7)$$

где ИП – истинно положительный результат;
 ИО – истинно отрицательный результат;
 ЛП – ложноположительный результат;
 ЛО – ложноотрицательный результат.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА КОМПОНЕНТОВ ЗАЩИТНЫХ СРЕД, СХЕМ ЛИОФИЛИЗАЦИИ ДИАГНОСТИКУМОВ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ ТУЛЯРЕМИЙНЫХ, 50 % ФОРМАЛИНИЗИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ БАРАНА И КОНТРОЛЬ ИХ СВОЙСТВ

3.1 Стабилизация диагностикумов эритроцитарных туляремийных, 50 % формализированных эритроцитов барана путем подбора защитной среды высушивания и схемы лиофилизации

Нами проведен подбор и оптимизация концентраций компонентов защитных сред, обуславливающих сохранность реагентов, входящих в набор эритроцитарных диагностикумов при лиофильном высушивании. При получении сухих сывороток и микробных взвесей нет необходимости в применении защитных сред высушивания, но лиофилизация диагностикумов эритроцитарных туляремийных и 50 % формализированных эритроцитов барана без данных сред не позволяет сохранить физико-химические и иммунобиологические показатели.

Защитная среда должна иметь мелкопористую, достаточно плотную структуру и обязательно быть гидрофильной. Однако желательно, чтобы концентрация компонентов не была слишком высокой, так как это может удлинить процесс сушки, создать повышенную остаточную влажность и снизить растворимость лиофилизата [67].

Для каждого препарата подбирается индивидуальная среда высушивания, она должна обеспечивать получение качественного сухого материала, иметь структурообразующий эффект.

Качество лиофилизатов можно оценить по следующим основным показателям: характерная структура высушенного материала без признаков микрооттаивания; потеря в массе при высушивании, не превышающая 3 %; быстрая растворимость препарата (1-2 мин); исходная цветность и прозрачность

после растворения, рН среды; сохранение чувствительности, специфичности и других свойств препарата.

При составлении композиции защитных сред необходимо использовать несколько разных наполнителей, потому что иногда требуются даже противоположные защитные функции, что подтверждается рядом исследователей [99, 101, 103, 108, 114, 195]. Соответственно, в экспериментальной работе были использованы различные ингредиенты, как составляющие разрабатываемых сред, например, ПАВ, которые могут уменьшить денатурацию белков во время замораживания за счет уменьшения границы раздела лёд-вода [171]. Также при введении в среду высушивания такого ПАВ, как твин 80, упрощается постановка реакции, и в качестве разводящей жидкости можно использовать 0,9 % раствор натрия хлорида рН (6,4±0,2). В свою очередь, углеводы связываются с поверхностью биологического материала и защищают препарат от повреждений при высыхании [3, 4, 5]. Углеводы с высокой молекулярной массой обладают меньшим защитным эффектом, чем более мелкие углеводы, поскольку существует меньше свободных гидроксильных групп, доступных для взаимодействия с белком [6, 185]. Поэтому в качестве эффективных лиопротекторов использовали дисахариды, такие как трегалоза или сахароза. Некоторыми исследователями было обнаружено, что добавление сахарозы к препаратам при лиофилизации приводит к сдвигу температуры плавления в сторону увеличения, таким образом, обеспечивая эффективную защиту препарата [165, 181]. Для лиофилизации в составе защитных сред также успешно применяются коллоиды (желатин, агар, пептон, молоко и сыворотки). Как показали исследования, желатин обладает сильным защитным действием, что вероятно, связано со способностью формировать при замораживании-высушивании аморфную фазу с низкой молекулярной подвижностью [35]. Из других коллоидов нужно отметить поливинилпирролидон (ПВП) – гидрофильный стабилизатор, обладающий выраженными хладозащитными свойствами [61] и полиглюкин (6 % раствор декстрана в физиологическом растворе), представляющий собой частично гидролизованный полимер глюкозы с

молекулярной массой около 60000 Да и защищающий препарат при замораживании. Декстран химически инертен и поэтому может быть использован в смеси с другими криопротекторами в составе многокомпонентных защитных сред [8]. В качестве антиоксиданта в некоторые составы была добавлена тиомочевина – сернистый аналог мочевины, обладающий мощной биологической активностью [89]. Композиции из декстрана и сахарозы при изготовлении в оптимальном соотношении обеспечивают более быстрые циклы сублимационной сушки с получением прочного лиофилизата и хорошей стабильностью белка [180].

Применение консервантов, таких как азид натрия, позволяет полностью предотвратить спонтанную агглютинацию и снижение чувствительности. Также, азид натрия, как активный антисептик, угнетает микробный пророст, что стало решающим фактором при использовании его как наиболее универсального консерванта.

Исходя из вышесказанного, при выполнении экспериментальных работ были изготовлены следующие композиции сред:

- вариант 1 – 40 % раствор лактозы;
- вариант 2 – полиглюкин (6 % раствор декстрана);
- вариант 3 – 3 % раствор ПВП;
- вариант 4 – 2 % раствор ПВП;
- вариант 5 – 1,5 % раствор ПВП;
- вариант 6 – 1 % раствор ПВП;
- вариант 7 – 15 % раствор сахарозы;
- вариант 8 – 3 % раствор ПВП, 15 % раствор сахарозы;
- вариант 9 – реополиглюкин (10 % коллоидный раствор декстрана);
- вариант 10 – желатин 1 %, тиомочевина 1 %, трегалоза 8 %;
- вариант 11 – желатин 1 %, тиомочевина 1 %, трегалоза 4 %;
- вариант 12 – тиомочевина 1 %, декстран 6 %;
- вариант 13 – желатин 1 %, декстран 6 %;
- вариант 14 – желатин 1 %, тиомочевина 1 %, сахароза 10 %;

- вариант 15 – желатин 1 %, тиомочевина 1 %, сахараза 5 %;
- вариант 16 – тиомочевина 1 %, трегалоза 4 %, полиглюкин;
- вариант 17 – 3 % сахараза; 0,2 % бычий сывороточный альбумин (БСА); 0,12 % натрия хлорид;
- вариант 18 – 4 % сахараза; 0,2 % БСА; 0,12 % натрия хлорид;
- вариант 19 – 3 % коллоидный раствор декстрана;
- вариант 20 – 0,9 % раствор натрия хлорида рН (6,4±0,2).

Целый объем свежеприготовленных сред делили на 2 группы: в первую добавляли твин 80 до 0,06 % и азид натрия до 0,01 % на рассчитанный объем; во вторую группу – только азид натрия в той же концентрации. Ингредиентный состав разрабатываемых защитных сред представлен в таблице 2.

Приготовленные диагностикумы: эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый жидкий, полученный путем сенсibilизации 20 % формализированных эритроцитов барана на цитратном буферном растворе (рН 5,0) с иммуноглобулинами, предварительно обработанными неионным ПАВ, с концентрацией белка 0,4 мг/мл согласно нашему патенту РФ на изобретение № 2747420 [116], и эритроцитарный туляремийный антигенный жидкий, полученный по ПР № 01897080-14-10 (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора), центрифугировали при (2900±100) об/мин в течение 15 мин, образовавшийся осадок ресуспендировали в средах высушивания (1:1) до образования 10 % взвеси, разливали в ампулы по 1,0 мл.

Получение стабильных препаратов без потери их чувствительности зависит от правильно подобранных параметров лиофилизации всех стадий процесса: замораживания, сублимации, досушивания, герметизации. На время проведения лиофилизации значительное влияние оказывает состав среды высушивания, температура материала, объём и концентрация белка препарата, давление в камере, температура конденсатора.

Таблица 2 – 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	-	-	-	-
Трегалоza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	4	-	-	-	-	4	-	-	-	-
Сахароза	-	-	-	-	-	-	15	15	-	-	-	-	-	10	5	-	3	4	-	-
Декстран	-	6	-	-	-	-	-	-	10	-	-	6	6	-	-	6	-	-	3	-
ПВП	-	-	3	2	1,5	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Лактоза	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
БСА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	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	-	-	-	-
Трегалоza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	4	-	-	-	-	4	-	-	-	-
Сахароза	-	-	-	-	-	-	15	15	-	-	-	-	-	10	5	-	3	4	-	-
Декстран	-	6	-	-	-	-	-	-	10	-	-	6	6	-	-	6	-	-	3	-
ПВП	-	-	3	2	1,5	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Лактоза	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
БСА	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,2	-	-
Натрия хлорид	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,12	0,12	-	0,9
Азид натрия	0,01																			

Начальный этап сублимационного высушивания препаратов – замораживание материала при нормальном атмосферном давлении в морозильной камере. Замораживание должно быть проведено таким образом, чтобы: а) продукт имел желаемую кристаллическую структуру; б) температура продукта была ниже, чем температура полного затвердевания (эвтектическая). Так, при температурах выше эвтектической точки в присутствии солей в белковых растворах может произойти денатурация белка [141]. Необходимо было подобрать оптимальную температуру, так как слишком низкая температура значительно увеличивает продолжительность процесса сушки. Поэтому сублимацию из замороженного состояния проводили при температуре продукта минус (40 ± 2) °С, позволяющей избежать оттаивания, при установке оптимального времени процесса высушивания. Препараты замораживали в морозильном ларе EL 21 SLT в течение 16-18 ч при температуре минус (40 ± 2) °С для дальнейшего высушивания в вакуумной камере сублимационной установки Alpha 2-4 LSCplus.

Стадия первичной сублимации или первичной сушки следует после замораживания материала и инициируется появлением вакуума в камере при постепенном нагреве замороженного препарата в объёме, достаточном для сублимации льда. В течение этого периода необходимо установить правильный баланс между объёмом подающегося тепла (теплопередачей) и сублимацией воды (массообменом), чтобы во время сушки не происходило чрезмерного перегрева замороженного материала и возникновения побочных явлений, таких как обратное плавление, вспучивание или разрушение.

Стадия десорбции или вторичная сушка начинается после сублимации льда и проходит при температуре выше нуля и более низком давлении для извлечения связанной влаги. Особенность данного этапа в том, что необходимо добиться определённых значений потери в массе при высушивании лиофилизата, при которых препарат сохраняет стабильность.

В ходе экспериментов были апробированы следующие протоколы сушки: «длительный» (20 ± 2) ч и «ускоренный» (13 ± 1) ч (таблица 3). При определении оптимальных режимов лиофильного высушивания диагностикумов исследовали

их устойчивость к резким температурным переходам на различных этапах сублимационного процесса, а также степень загруженности сублимационной камеры. С увеличением количества ампул в сублимационной камере возрастают объемы пара, возникающие при сублимации, что создает дополнительные нагрузки на конденсатор и вакуумный насос. Учитывая вышесказанное, объем серии препарата при отработке каждого режима составлял 100-110 ампул по 1,0 мл 10 % взвеси эритроцитарных диагностикумов.

Таблица 3 – Режимы лиофилизации

Время, ч	Режим (20±2) ч		Режим (13±1) ч		Температура конденсатора, °С	Вакуум, мбар
	Температура, °С		Температура, °С			
	Полки	Продукта	Полки	Продукта		
1	минус 10	минус 35	10	минус 20	минус (86±1)	(0,21±1)
2	минус 10	минус 30	10	минус 15	минус (87±1)	(0,21±1)
3	минус 10	минус 24	10	минус 5	минус (87±1)	(0,24±1)
4	минус 10	минус 17	15	5	минус (86±1)	(0,24±1)
5	минус 10	минус 10	15	10	минус (86±1)	(0,24±1)
6	10	минус 6	20	12	минус (86±1)	(0,24±1)
7	10	минус 3	25	18	минус (88±1)	(0,24±1)
8	10	0	30	22	минус (88±1)	(0,24±1)
9	10	4	30	26	минус (88±1)	(0,21±1)
10	10	9	30	28	минус (88±1)	(0,21±1)
11	15	11	30	28	минус (86±1)	(0,21±1)
12	15	15	30	28	минус (86±1)	(0,24±1)
13	20	18			минус (86±1)	(0,24±1)
14	20	20			минус (86±1)	(0,24±1)
15	25	22			минус (86±1)	(0,24±1)
16	25	24			минус (86±1)	(0,24±1)
17	25	24			минус (86±1)	(0,24±1)
18	25	24			минус (86±1)	(0,24±1)
19	25	24			минус (86±1)	(0,24±1)

При включении лиофильной камеры Alpha 2-4 LSC plus выставляли параметры сушки, запускали в работу насос на 15-20 мин и быстро перегружали замороженный в ампулах препарат в вакуумную камеру сублимационной установки, с последующим включением вакуума. При включении вакуума происходило снижение давления в камере. На данном этапе отмечалось незначительное изменение температуры замороженного материала за счёт отвода тепла сублимации, который осуществлялся при максимально низком давлении в сушильной камере 0,15-0,25 мбар (15-25 Па) без подвода тепла к просушиваемому

материалу. Включали нагрев полок и за счёт поступления тепла к продукту температура последнего начинала повышаться. Вследствие чего происходило интенсивное испарение влаги из продукта.

Продолжительность стадии процесса сублимационной сушки, во время которой температура высушиваемого материала достигает температуры минус 10 °С, составляла для экспериментальных серий диагностикума при режиме (13±1) ч – (2,0±0,5) ч и при (20±2) ч – (5,0±0,5) ч. Этот период характеризовался большой интенсивностью тепло- и массообмена. Так как движущей силой процесса сублимации является разность парциального давления насыщенных паров материала и конденсатора или разность соответствующих этим давлениям температур материала и конденсатора, во время сублимации строго поддерживалось низкое давление в камере, порядка 0,15-0,25 мбар (15-25 Па), и как можно более низкая температура конденсатора – минус 80-90 °С.

Повышение температуры препаратов от минус 10 °С до 10 °С происходило в течение (3,0±0,5) ч для режима (13±1) ч и в течение (5,0±0,5) ч – (20±2) ч. Этап десорбции, то есть удаление связанной влаги, происходил медленно, что являлось следствием увеличения энергии связи влаги с материалом. Для диагностикума (100 ампул по 1,0 мл 10 % взвеси в ампуле) – (4,0±0,5) ч при режиме (13±1) ч и (7,0±0,5) ч – (20±2) ч. Температура препарата постоянно росла до значения максимальной температуры досушивания, т.е. равновесного влагосодержания, практически равного остаточной влажности. Температура продукта должна быть высокой, однако ниже температуры, при которой продукт денатурирует. Оптимальная температура для препаратов составила при режиме (13±1) ч (27±1) °С и при режиме (20±2) ч – (23±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; вакуум – 0,15-0,25 мбар (15-25 Па); температура полок – 30 °С (для режима (13±1) ч) и 25 °С (для режима (20±2) ч); температура продукта – (27±1) °С (для режима (13±1) ч) и (23±1) °С (для режима (20±2) ч).

После завершения процессов высушивания ампулы с диагностикумом извлекали из камеры и запаивали на газо-кислородной горелке в среде атмосферного воздуха. Опай ампул с диагностикумом проводили в сухом помещении, так как все биопрепараты в лиофилизированном состоянии обладают высокой степенью гидрофильности.

Общая схема получения диагностикумов эритроцитарных туляремийных лиофилизированных представлена на рисунке 5.



Рисунок 5 – Схема получения диагностикумов эритроцитарных туляремийных лиофилизированных

3.2 Контроль физико-химических показателей и определение аналитической чувствительности и специфичности лиофилизированных препаратов

Контроль лиофилизированных диагностикумов, высушенных при двух режимах, осуществляли в два этапа: по физико-химическим и иммунобиологическим показателям.

Из каждой серии лиофилизатов отбирали пробы в количестве трех образцов и проводили оценку внешнего вида сухого препарата (структура и цвет таблетки), растворимости (время, цвет, наличие конгломератов), внешнего вида после отстаивания (цвет, прозрачность раствора), потерю в массе при высушивании, согласно ОФС.1.4.1.0031.18 [88], ГОСТ Р 51352-2013 [22] и ОФС.1.2.1.0010.15 [86].

По полученным результатам, представленным в таблице 4, было установлено, что варианты №№ 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 19, 20 отличались высокими показателями потери в массе при высушивании, плохой растворимостью, наличием конгломератов, что не соответствовало требованиям, предъявляемым к лиофилизированным препаратам, и в дальнейшем не использовались для контроля. Полученные результаты лиофилизированных диагностикумов при длительном режиме (20 ± 2) ч лиофильного высушивания полностью идентичны, как и при ускоренном режиме (13 ± 1) ч.

Далее проводили контроль диагностикумов по иммунобиологическим показателям (аналитическая чувствительность и аналитическая специфичность) в РНГА макро- и микрометодами. Традиционно для постановки РНГА требовалась специальная разводящая жидкость. В нашем случае, благодаря подобранной композиции среды высушивания с содержанием твин 80, появилась возможность осуществлять постановку реакций только на 0,9 % растворе натрия хлорида рН ($6,4 \pm 0,2$).

Таблица 4 – Характеристика физико-химических показателей диагностикумов после лиофилизации режимом (13±1) ч с различными средами высушивания

№	Внешний вид лиофилизированных препаратов	Растворимость/ внешний вид после растворения	Внешний вид после отстаивания	Потеря в массе при высушивании
1	2	3	4	5
1/1	Вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, без признаков микрооттаивания	1 мин Равномерная взвесь коричневого цвета	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, разбивающийся при встряхивании	2,7 %
1/2				2,5 %
2/1	Вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, без признаков микрооттаивания	30 сек Равномерная взвесь коричневого цвета	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, разбивающийся при встряхивании	2,6 %
2/2				2,3 %
3/1	Вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, без признаков микрооттаивания	3 мин Наличие конгломератов	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, не разбивающийся при встряхивании	3,1 %
3/2				3,5 %
4/1	Вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, без признаков микрооттаивания	3 мин Наличие конгломератов	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, не разбивающийся при встряхивании	3,7 %
4/2				3,8 %
5/1	Вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, без признаков микрооттаивания	3 мин Наличие конгломератов	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, не разбивающийся при встряхивании	3,3 %
5/2				3,5 %
6/1	Вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, без признаков микрооттаивания	3 мин Наличие конгломератов	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, не разбивающийся при встряхивании	3,6 %
6/2				3,7 %
7/1	Вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, без признаков микрооттаивания	1 мин Равномерная взвесь коричневого цвета	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, разбивающийся при встряхивании	2,7 %
7/2				2,5 %
8/1	Вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, без признаков микрооттаивания	1 мин Равномерная взвесь коричневого цвета	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, разбивающийся при встряхивании	2,6 %
8/2				2,7 %

1	2	3	4	5
9/1	Вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, без признаков микрооттаивания	1 мин Равномерная взвесь коричневого цвета	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, разбивающийся при встряхивании	2,5 %
9/2				2,8 %
10/1	Вид пористой массы, коричневого цвета, с признаками микрооттаивания	Плохо растворялся	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, не разбивающийся при встряхивании	3,5 %
10/2				3,1 %
11/1	Вид пористой массы, коричневого цвета, с признаками микрооттаивания	Плохо растворялся	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, не разбивающийся при встряхивании	3,7 %
11/2				3,5 %
12/1	Вид пористой массы, коричневого цвета, с признаками микрооттаивания	Плохо растворялся	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, не разбивающийся при встряхивании	3,6 %
12/2				3,5 %
13/1	Вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, с признаками микрооттаивания	Плохо растворялся	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, не разбивающийся при встряхивании	3,6 %
13/2				3,6 %
14/1	Вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, без признаками микрооттаивания	1 мин Равномерная взвесь коричневого цвета	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, разбивающийся при встряхивании	2,5 %
14/2				2,8 %
15/1	Вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, без признаков микрооттаивания	1 мин Равномерная взвесь коричневого цвета	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, разбивающийся при встряхивании	2,5 %
15/2				2,7 %
16/1	Вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, без признаков микрооттаивания	1 мин Равномерная взвесь коричневого цвета	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, разбивающийся при встряхивании	2,7 %
16/2				2,6 %
17/1	Вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, с признаками микрооттаивания	Плохо растворялся	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, не разбивающийся при встряхивании	3,5 %
17/2				3,8 %
18/1	Вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, с признаками микрооттаивания	Плохо растворялся	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, не разбивающийся при встряхивании	3,7 %
18/2				3,6 %

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5
19/1	Вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, с признаками микрооттаивания	5 мин Наличие конгломератов	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, не разбивающийся при встряхивании	3,1 %
19/2				3,5 %
20/1	Вид порошка коричневого цвета, с признаками микрооттаивания	Плохо растворялся	2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и коричневый осадок, разбивающийся при встряхивании на конгломераты	3,6 %
20/2				3,5 %

Для контроля диагностикума туляремийного иммуноглобулинового сухого 10 % применяли гомологичные и гетерологичные штаммы. Взвеси штаммов в разведении 1×10^9 м.к./мл по ОСО мутности 42-28-85 прогревали при температуре (100 ± 1) °С в течение 20 мин с последующим добавлением формалина до 2 % концентрации и оставляли на 2 ч при температуре (22 ± 4) °С. Далее гомологичную взвесь разводили до концентрации $5,0 \times 10^7$ м.к./мл 0,9 % раствором натрия хлорида, гетерологичные взвеси – до концентрации $4,0 \times 10^8$ м.к./мл.

Для контроля диагностикума туляремийного антигенного сухого 10 % использовали коммерческие гомологичные и гетерологичные сыворотки. Туляремийную сыворотку разводили 0,9 % раствором натрия хлорида до разведения 1:2500, сыворотки бруцеллѐзную, холерную, сальмонеллѐзную – 1:50.

Диагностикумы эритроцитарные туляремийные сухие 10 % разводили 0,9 % раствором натрия хлорида до получения 2,5 % рабочего разведения для макрометода и 0,5 % – для микрометода. Перед постановкой реакций встряхивали до образования равномерной взвеси. В качестве контроля (K^+) использовали жидкие формы диагностикумов.

Учет результатов осуществляли визуально по степени агглютинации эритроцитов через $(2,5 \pm 0,5)$ ч (предварительный для макро- и окончательный для микрометода) и (21 ± 3) ч (окончательный для макрометода). Результат считали положительным, если эритроциты выпадали на дно лунок равномерным слоем в виде «зонтика», занимая не менее $2/3$ диаметра сферической поверхности в лунке (в ряде случаев возможно фестончатое оплывание краев агглютината). При отрицательном результате эритроциты выпадали на дно лунки в виде «пуговики» или узкого колечка с ровным краем.

Характеристика диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового сухого 10 % по иммунобиологическим показателям представлена в таблице 5.

Из приведенных в таблице 5 данных видно, что наилучшая аналитическая чувствительность с концентрацией $7,8 \times 10^5$ м.к./мл для макрометода и $1,56 \times 10^6$ м.к./мл для микрометода характерна для диагностикумов

лиофилизированных с вариантами сред 2/1 и 15/1. В постановке реакции с гетерологичными штаммами получен отрицательный ответ в 100 % случаях.

Таблица 5 – Характеристика диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового сухого 10 % по иммунобиологическим показателям в зависимости от сред высушивания

№ серии	Макрометод		Микрометод		Аналитическая специфичность
	РНГА	К ⁻	РНГА	К ⁻	
1	2	3	4	5	6
К ⁺	$7,8 \times 10^5$	+	$1,56 \times 10^6$	+	отсутствие перекрестных реакций
1/1	$6,25 \times 10^6$	+	$1,25 \times 10^7$	+	отсутствие перекрестных реакций
2/1	$7,8 \times 10^5$	+	$1,56 \times 10^6$	+	отсутствие перекрестных реакций
7/1	$6,25 \times 10^6$	+	$1,25 \times 10^7$	+	отсутствие перекрестных реакций
8/1	$1,25 \times 10^7$	+	$2,5 \times 10^7$	+	отсутствие перекрестных реакций
9/1	$1,25 \times 10^7$	+	$2,5 \times 10^7$	+	отсутствие перекрестных реакций
14/1	$6,25 \times 10^6$	+	$1,25 \times 10^7$	+	отсутствие перекрестных реакций
15/1	$7,8 \times 10^5$	+	$1,56 \times 10^6$	+	отсутствие перекрестных реакций
16/1	$6,25 \times 10^6$	+	$1,25 \times 10^7$	+	отсутствие перекрестных реакций
1/2	Отсутствие четко сформированного отрицательного контроля				
2/2					
7/2					
8/2					
9/2					
14/2					
15/2					
16/2					

Примечание: «К⁺» – диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый жидкий; «+» – отрицательный контроль в виде «пуговки».

Результаты аналитической чувствительности и специфичности диагностикума эритроцитарного туляремийного антигенного сухого 10 % представлены в таблице 6.

Из таблицы 6 следует, что аналитическая чувствительность диагностикума туляремийного антигенного выше при использовании сред высушивания 2/1 и 15/1 и составила 1:40000 – макрометодом и 1:20000 – микрометодом с туляремийной сывороткой, помимо этого диагностикумы специфичны и не дают перекрестных реакций с пробами, содержащими гетерологичные сыворотки, что полностью совпадает с показателями диагностикума эритроцитарного туляремийного жидкого (РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ).

Таблица 6 – Характеристика диагностикума эритроцитарного туляремийного антигенного сухого 10 % по иммунобиологическим показателям в зависимости от сред высушивания

№ серии	Макрометод		Микрометод		Аналитическая специфичность
	РНГА	К ⁻	РНГА	К ⁻	
1	2	3	4	5	6
К ⁺	1:40000	+	1:20000	+	отсутствие перекрестных реакций
1/1	1:5000	+	1:2500	+	отсутствие перекрестных реакций
2/1	1:40000	+	1:20000	+	отсутствие перекрестных реакций
7/1	1:5000	+	1:2500	+	отсутствие перекрестных реакций
8/1	1:10000	+	1:5000	+	отсутствие перекрестных реакций
9/1	1:10000	+	1:5000	+	отсутствие перекрестных реакций
14/1	1:10000	+	1:5000	+	отсутствие перекрестных реакций
15/1	1:40000	+	1:20000	+	отсутствие перекрестных реакций
16/1	1:5000	+	1:2500	+	отсутствие перекрестных реакций
1/2	Отсутствие четко сформированного отрицательного контроля				
2/2					
7/2					
8/2					
9/2					
14/2					
15/2					
16/2					

Примечание: «К⁺» – диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный жидкий; «+» – отрицательный контроль в виде «пуговки».

Высушенные диагностикумы при режимах лиофилизации (13±1) ч и (20±2) ч полностью совпадали по иммунобиологическим показателям.

Для дальнейшей работы нами выбрана многокомпонентная среда высушивания № 15/1 (желатин 1 %, тиомочевина 1 %, сахараза 5 %, твин 80 0,06 %, азид натрия 0,01 %), которая предотвращает разрушение диагностикумов при замораживании и лиофилизации и позволяет сохранять нативные свойства препаратов. В качестве режима лиофилизации использовали оптимальный вариант (13±1) ч, так как сокращение периода удаления свободной воды почти вдвое не влияет на физико-химические и иммунобиологические показатели препаратов после сушки (рисунок 6).

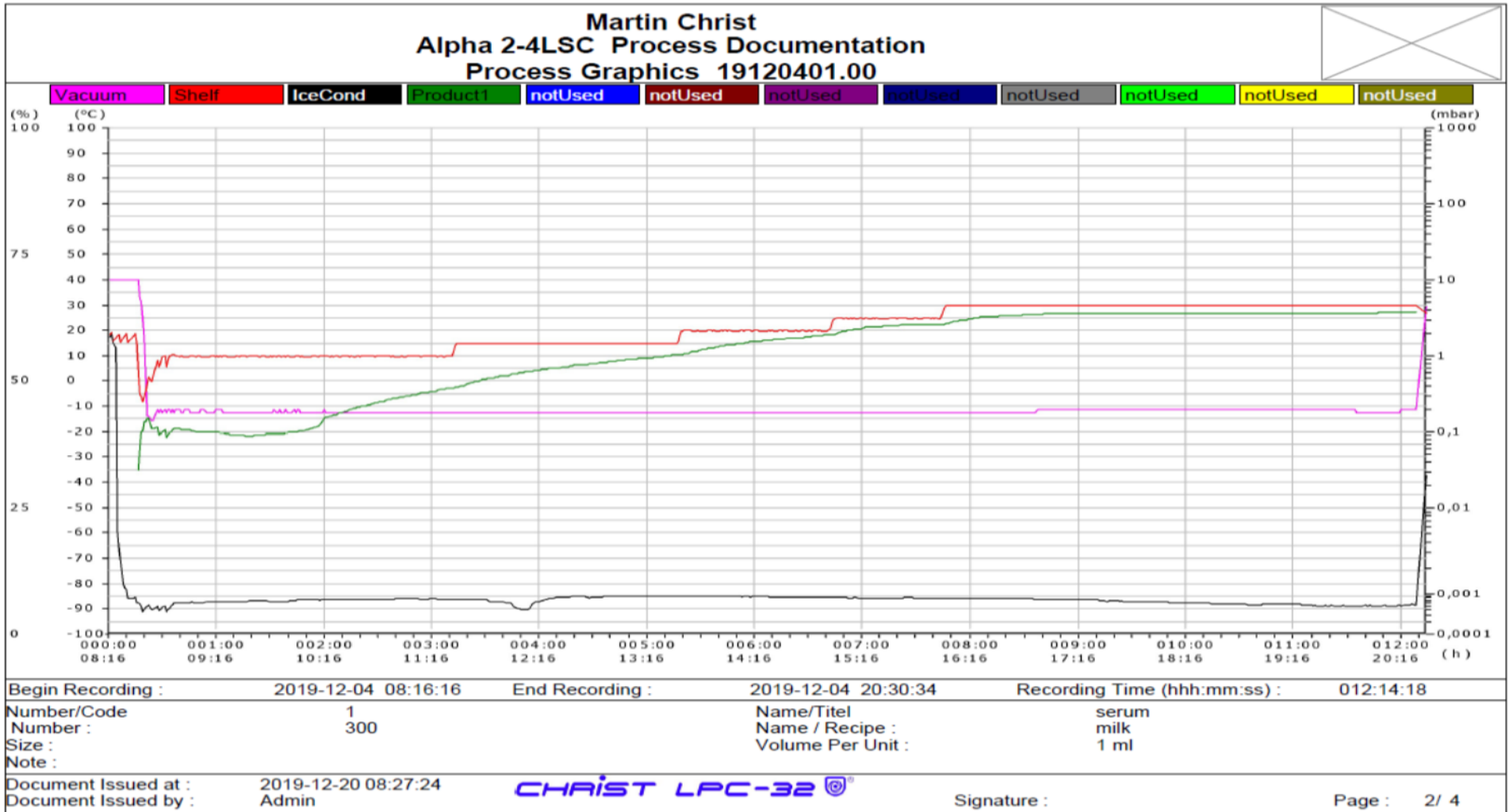


Рисунок 6 – График лиофилизации диагностикумов эритроцитарных туляремийных при режиме высушивания (13±1) ч

Аналогичным способом переводили в среду высушивания № 15/1 и лиофилизировали при режиме (13 ± 1) ч 50 % формализированные эритроциты барана, предварительно разлив их по 2,0 мл во флаконы. При проверке физико-химических показателей 50 % формализированных эритроцитов барана сухих установлено, что они представляли собой аморфную массу коричневого цвета. В течение 1 мин содержимое флакона с эритроцитами сухими полностью растворялось в 2,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида рН $(6,4 \pm 0,2)$, образуя гомогенную взвесь коричневого цвета. При стоянии образовывалось 2 слоя: прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, разбивающийся при встряхивании. Полученные показатели соответствуют требованиям, предъявляемым к лиофилизатам по ОФС.1.4.1.0031.18 [86], ГОСТ Р 51352-2013 [22] и ОФС.1.2.1.0010.15 [86].

50 % формализированные эритроциты барана сухие в дальнейшем использовали для адсорбции гетерологичных гемагглютинирующих антител исследуемых сывороток, применяемых в РНГА с диагностикумом эритроцитарным туляремийным 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.

Таким образом, по результатам проведенных исследований были получены и высушены по 5 серий (по 100 ампл.) диагностикумов туляремийных эритроцитарных 10 % и 50 % формализированных эритроцитов барана.

Препараты контролировали по физико-химическим показателям. Внешний вид диагностикумов и 50 % формализированных эритроцитов барана представлены на рисунке 7.



а

б

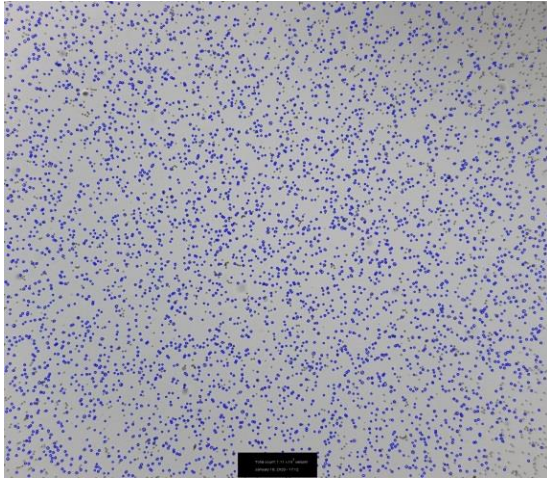
Рисунок 7 – Внешний вид диагностикумов эритроцитарных туляремийных (а) и 50 % эритроцитов барана формализированных (б)

Отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов определяли путем добавления к 2,5 % взвеси диагностикума 0,9 % раствора натрия хлорида (1:1). Через 4 ч формировался осадок в виде «пуговки» (в макропланшете).

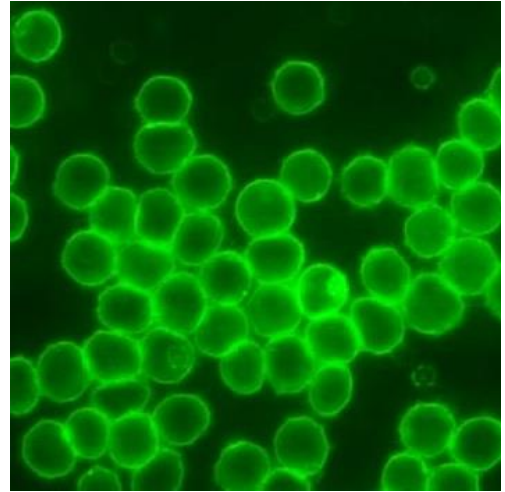
Количество эритроцитов подсчитывали на автоматическом счетчике клеток ТС 20. В 1 мм³ 2,5 % диагностикума содержалось $(4,4 \pm 0,5) \times 10^6$ эритроцитов (рисунок 8 (а)).

Морфологию исследовали на автоматической цифровой системе для подготовки виртуальных препаратов и морфологического анализа в флуоресцентной микроскопии Vision Epi, окрашивая препарат флуоресцентным красителем (рисунок 8 (б)). На рисунке представлены иммобилизованные эритроциты барана округлой формы с размером 3,9 мкм, без признаков деформации.

Для проведения сравнительного анализа диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового лиофилизированного без среды высушивания и со средой изучали ориентацию в пространстве (x, y, z), выделение отдельных областей реконструированных материалов и 3D визуализацию в двух программах: DataViewer и CTvox.



а



б

Рисунок 8 – Диагностикум эритроцитарный в автоматическом счетчике частиц (а) и на автоматической цифровой системе (увеличение $\times 1000$) (б)

На рисунке 9 представлена 3D визуализация диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового сухого без среды высушивания в программе DataViewer.

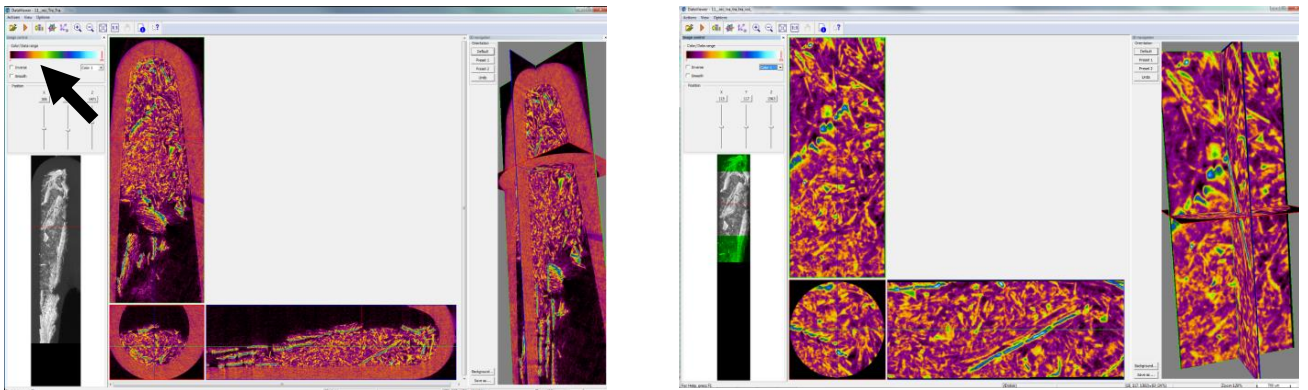


Рисунок 9 – 3D визуализация диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового сухого без среды высушивания в программе DataViewer. (стрелкой указано распределение цветов в зависимости от рентгенплотности (от черного к светлому цвету плотность увеличивается))

3D объемная визуализация пробы с линейными размерами в программе СТvox представлена на рисунке 10.

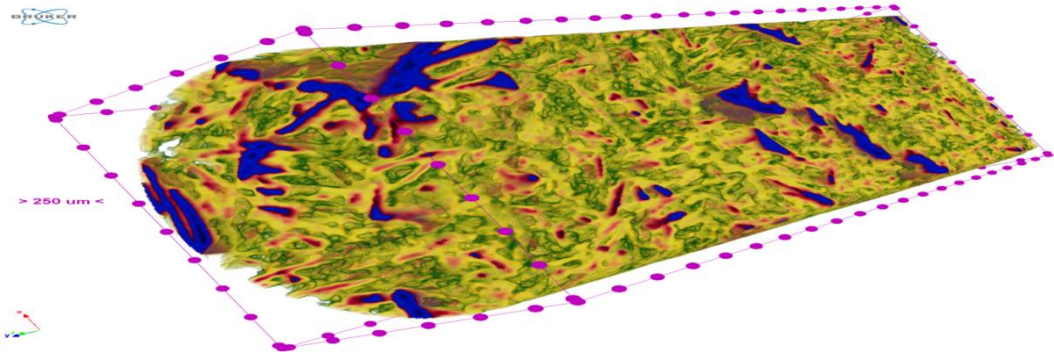


Рисунок 10 – 3D объемная визуализация диагностикума эритроцитарного туляреимийного иммуноглобулинового сухого без среды высушивания с линейными размерами в программе СТvox (синим цветом выделены самые плотные частицы, затем красным, желтым и в итоге зеленым - менее плотные)

Из рисунков 9 и 10 следует, что структура диагностикума равномерная с включением частиц с относительно высокой плотностью. Средняя плотность по всей пробе - минус 390,3 хаунсфильдов (НУ).

Аналогичные исследования проводились с диагностикумом эритроцитарным туляреимийным лиофилизированным в среде высушивания в программе DataViewer (рисунок 11).

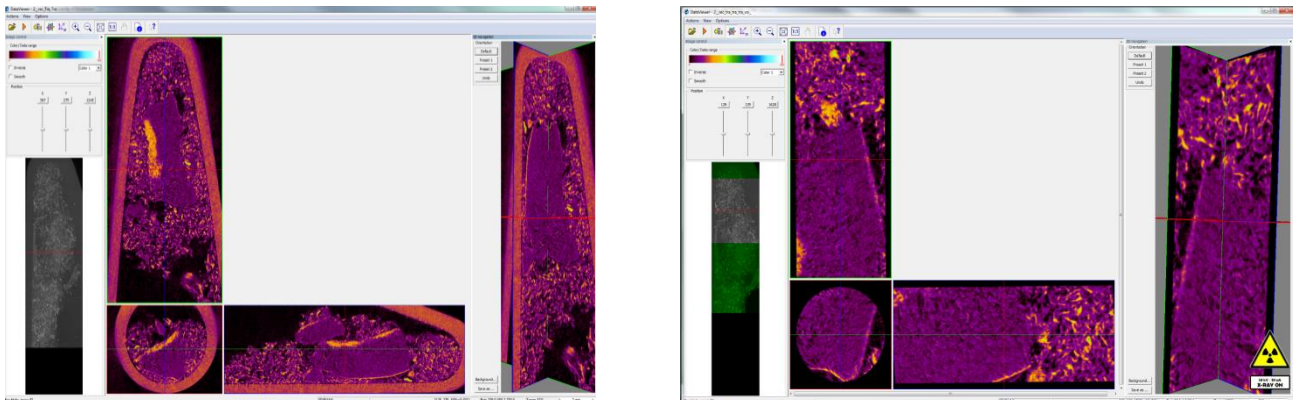


Рисунок 11 – 3D визуализация диагностикума эритроцитарного туляреимийного иммуноглобулинового лиофилизированного в среде высушивания в программе DataViewer

3D объемная визуализация пробы с линейными размерами в программе СТvox представлена на рисунке 12.

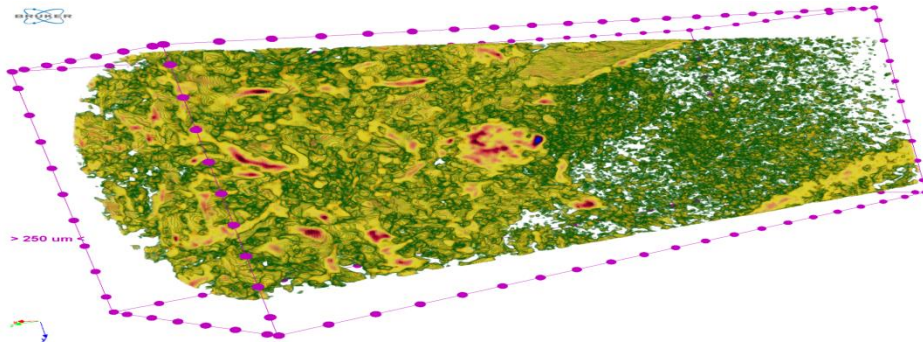


Рисунок 12 – 3D объемная визуализация диагностикума эритроцитарного туляреимийного иммуноглобулинового лиофилизированного в среде высушивания с линейными размерами в программе CTvox

Из рисунков 11 и 12 следует, что структура диагностикума неравномерная с низкой плотностью. Средняя плотность по всей пробе - минус 697,9 НУ, что ниже плотности структуры диагностикума без среды высушивания (минус 390,3 НУ).

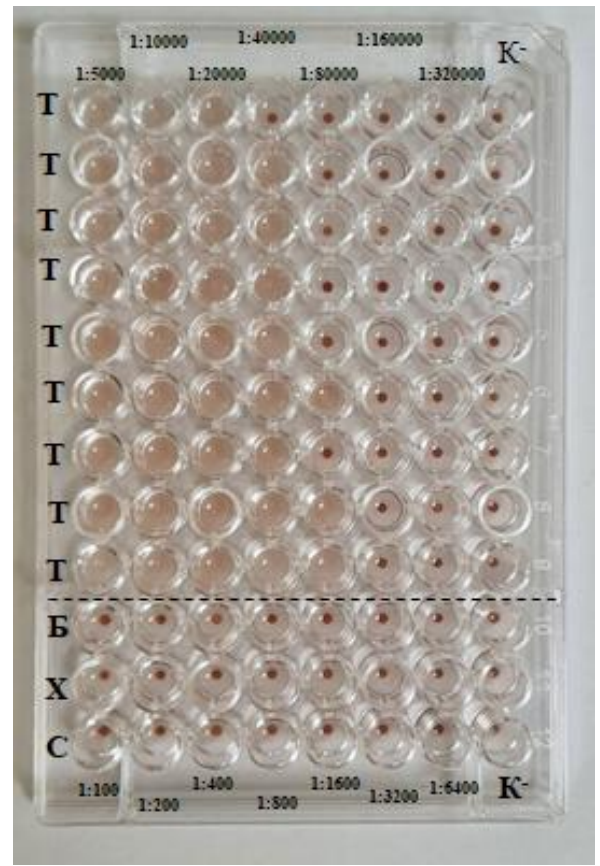
Вероятно, это связано с влиянием многокомпонентного состава среды высушивания, состоящей из углеводной основы, коллоида, неионного ПАВ и консерванта, которая позволяет уменьшить денатурацию белков во время замораживания и лиофилизации и стабилизировать препарат.

Контроль аналитической чувствительности и специфичности диагностикумов эритроцитарных туляреимийных сухих проводили в РНГА.

Для дополнительного контроля аналитической специфичности использовали РТНГА. РНГА считают специфичной, если в РТНГА гемагглютинация отсутствует или наблюдается по сравнению с РНГА на 3-4 лунки меньше. Полученные результаты в РНГА и РТНГА представлены на рисунке 13 и в таблицах 7 и 8.



а



б

Рисунок 13 – Контроль аналитической чувствительности и специфичности
(а) диагностикума эритроцитарного туляремиального иммуноглобулинового сухого
10 % (микрометод) (выборочно)

(F.) – взвеси *F. tularensis* в концентрации $2,5 \times 10^7$ м.к./мл;

(B.) – взвесь *B. abortus* 19ВА в концентрации $4,0 \times 10^8$ м.к./мл;

(S.) – взвесь *S. typhimurium* 9640 в концентрации $4,0 \times 10^8$ м.к./мл;

(Y.) – взвесь *Y. enterocolitica* 64 в концентрации $4,0 \times 10^8$ м.к./мл;

(E.) – взвесь *E. coli* 118 в концентрации $4,0 \times 10^8$ м.к./мл;

(K) – отрицательный контроль и

(б) диагностикума эритроцитарного туляремиального антигенного сухого 10 %
(микрометод) (выборочно)

(T) – туляремиальные сыворотки в разведении 1:2500;

(B) – бруцеллезная сыворотка в разведении 1:50;

(X) – холерная сыворотка в разведении 1:50;

(C) – сальмонеллезная сыворотка в разведении 1:50;

(K) – отрицательный контроль.

Таблица 7 – Контроль аналитической чувствительности и специфичности диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового сухого 10 % (макротест) (выборочно)

Штаммы		Диагностикум туляремийный эритроцитарный иммуноглобулиновый сухой						Диагностикум эритроцитарный иммуноглобулиновый жидкий серия 1-20
		Серия 2			Серия 3			
		1	2	3	1	2	3	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	РНГА	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵
	РТНГА	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷
<i>F. tularensis</i> Miura	РНГА	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶	7,8×10 ⁵	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶
	РТНГА	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷	1,25×10 ⁷	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷
<i>F. tularensis</i> Schu	РНГА	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵
	РТНГА	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷
<i>F. tularensis</i> 55	РНГА	3,12×10 ⁶	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶
	РТНГА	–	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷	–	–	–	–
<i>F. tularensis</i> holarctica biovar II, ery R (c-3) 144/713	РНГА	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶	7,8×10 ⁵	1,56×10 ⁶
	РТНГА	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷	1,25×10 ⁷	2,5×10 ⁷
<i>F. tularensis</i> holarctica biovar II, ery R (c-52) 7	РНГА	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵
	РТНГА	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷
<i>F. tularensis</i> holarctica biovar II, ery R (c-7) 296/19	РНГА	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶
	РТНГА	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷
<i>F. tularensis</i> holarctica biovar II, ery R (c-72) 21	РНГА	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶
	РТНГА	–	–	–	–	–	–	–
<i>F. tularensis</i> holarctica biovar I, ery S (c-81) 124	РНГА	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶
	РТНГА	–	–	–	–	–	–	–
<i>F. tularensis</i> holarctica biovar II, ery R (c-106) 202	РНГА	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶	7,8×10 ⁵	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶	1,56×10 ⁶
	РТНГА	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷	1,25×10 ⁷	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷	2,5×10 ⁷
<i>F. tularensis</i> holarctica biovar I, ery S (c-9) 298/31	РНГА	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶	3,12×10 ⁶
	РТНГА	–	–	–	–	–	–	–
<i>F. tularensis</i> holarctica biovar II, ery R 30	РНГА	7,8×10 ⁵	1,56×10 ⁶	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵	7,8×10 ⁵
	РТНГА	1,25×10 ⁷	2,5×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷	1,25×10 ⁷

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>F. tularensis</i> holarctica biovar II, ery R 114	РНГА	$3,12 \times 10^6$	$3,12 \times 10^6$	$3,12 \times 10^6$	$3,12 \times 10^6$	$3,12 \times 10^6$	$3,12 \times 10^6$	$3,12 \times 10^6$
	РТНГА	–	–	–	–	–	–	–
<i>F. tularensis</i> holarctica biovar II, ery R 115	РНГА	$3,12 \times 10^6$	$3,12 \times 10^6$	$3,12 \times 10^6$	$3,12 \times 10^6$	$3,12 \times 10^6$	$3,12 \times 10^6$	$3,12 \times 10^6$
	РТНГА	–	–	–	–	–	–	–
<i>F. tularensis</i> holarctica biovar II, ery R (c-116) 7	РНГА	$1,56 \times 10^6$	$1,56 \times 10^6$	$1,56 \times 10^6$	$1,56 \times 10^6$	$1,56 \times 10^6$	$1,56 \times 10^6$	$1,56 \times 10^6$
	РТНГА	$2,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
<i>F. tularensis</i> holarctica biovar II, ery R 137	РНГА	$7,8 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$
	РТНГА	$1,25 \times 10^7$	$1,25 \times 10^7$	$1,25 \times 10^7$	$1,25 \times 10^7$	$1,25 \times 10^7$	$1,25 \times 10^7$	$1,25 \times 10^7$
<i>B. abortus</i> 19BA	РЕЗУЛЬТАТЫ В РНГА ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ							
<i>B. melitensis</i> Rev-1								
<i>B. suis</i> 61								
<i>Y. enterocolitica</i> 64								
<i>Y. enterocolitica</i> 178								
<i>Y. enterocolitica</i> 383								
<i>S. typhimurium</i> 9640								
<i>E. coli</i> 118								

Примечание: «–» – отрицательный контроль в виде «пуговки».

Таблица 8 – Контроль аналитической чувствительности и специфичности диагностикума эритроцитарного туляремийного антигенного сухого 10 % (макрометод) (выборочно)

Сыворотки		Диагностикум туляремийный эритроцитарный антигенный сухой						«РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ» серия 4-19
		Серия 2			Серия 3			
		1	2	3	1	2	3	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Сыворотка гипериммунная туляремийная № 30 от 2017 г.	РНГА	1:20000	1:40000	1:20000	1:40000	1:40000	1:20000	1:20000
	РТНГА	–	–	–	–	–	–	–
Сыворотка гипериммунная туляремийная № 31 от 2017 г.	РНГА	1:40000	1:40000	1:80000	1:40000	1:80000	1:40000	1:40000
	РТНГА	–	–	1:5000	–	1:5000	–	–
Сыворотка гипериммунная туляремийная № 32 от 2017 г.	РНГА	1:80000	1:40000	1:40000	1:40000	1:80000	1:40000	1:40000
	РТНГА	1:5000	–	–	–	1:5000	–	–
Сыворотка гипериммунная туляремийная № 33 от 2017 г.	РНГА	1: 40000	1:40000	1:80000	1:80000	1:40000	1:40000	1:40000
	РТНГА	–	–	1:5000	1:5000	–	–	–
Сыворотка гипериммунная туляремийная № 34 от 2018 г.	РНГА	1:40000	1:80000	1:40000	1:80000	1:40000	1:40000	1:40000
	РТНГА	–	1:5000	–	1:5000	–	–	–
Сыворотка гипериммунная туляремийная № 35 от 2018 г.	РНГА	1:20000	1:40000	1:40000	1:20000	1:40000	1:20000	1:20000
	РТНГА	–	–	–	–	–	–	–
Сыворотка гипериммунная туляремийная № 36 от 2018 г.	РНГА	1:40000	1:20000	1:40000	1:20000	1:40000	1:20000	1: 20000
	РТНГА	–	–	–	–	–	–	–
Сыворотка гипериммунная туляремийная № 37 от 2018 г.	РНГА	1:40000	1:80000	1:40000	1:40000	1:40000	1:80000	1:40000
	РТНГА	–	1:5000	–	–	–	1:5000	–
Сыворотка гипериммунная туляремийная № 38 от 2019 г.	РНГА	1:80000	1:40000	1:40000	1:40000	1:40000	1:80000	1:40000
	РТНГА	1:5000	–	–	–	–	1:5000	–

Продолжение таблицы 8

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Сыворотка гипериммунная туляремийная № 39 от 2019 г.	РНГА	1:40000	1:40000	1:20000	1:40000	1:20000	1:40000	1:20000
	РТНГА	–	–	–	–	–	–	–
Сыворотка гипериммунная туляремийная № 40 от 2019 г.	РНГА	1:80000	1:80000	1:40000	1:40000	1:80000	1:80000	1:40000
	РТНГА	1:5000	1:5000	–	–	1:5000	1:5000	–
Сыворотка гипериммунная туляремийная № 41 от 2019 г.	РНГА	1:20000	1:40000	1:40000	1:40000	1:40000	1:20000	1:20000
	РТНГА	–	–	–	–	–	–	–
Сыворотка гипериммунная туляремийная № 42 от 2019 г.	РНГА	1:80000	1:40000	1:40000	1:80000	1:40000	1:80000	1:40000
	РТНГА	1:5000	–	–	1:5000	–	1:5000	–
Сыворотка диагностическая туляремийная сухая для РА	РНГА	1:40000	1:80000	1:40000	1:80000	1:40000	1:40000	1:40000
	РТНГА	–	1:5000	–	1:5000	–	–	–
Сыворотка диагностическая поливалентная бруцеллёзная сухая для РА	РЕЗУЛЬТАТЫ В РНГА ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ							
Сыворотка диагностическая холерная О1 адсорбированная сухая для РА								
Сыворотки диагностические сальмонеллёзные адсорбированные О-поливалентные для реакции агглютинации								

Примечание: «←» – отрицательный контроль в виде «пуговки».

Установлено, что препараты специфичны и не дают перекрёстных реакций с гетерологичными пробами. Аналитическая чувствительность диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового сухого 10 % составила $7,8 \times 10^5$ - $3,12 \times 10^6$ м.к./мл при выполнении макрометодом РНГА и $1,56 \times 10^6$ - $6,25 \times 10^6$ м.к./мл при использовании микрометода; для диагностикума эритроцитарного туляремийного антигенного сухого 10 % – 1:20000-1:80000 для макрометода и 1:10000-1:40000 для микрометода.

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 также позволяя осуществлять постановку реакции без применения специальной разводящей жидкости.

Приоритетность исследований подтверждена 3 патентами РФ на изобретение: патент № 2708636 от 10.12.2019 «Универсальная среда высушивания для стабилизации эритроцитарных диагностикумов туляремийных»; патент № 2747420 от 04.05.2021 «Способ приготовления эритроцитарного диагностикума иммуноглобулинового туляремийного»; патент № 2749355 от 09.06.2021 «Способ лиофилизации эритроцитарных диагностикумов туляремийных» (Приложения 1-3).

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДИАГНОСТИКУМОВ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ ТУЛЯРЕМИЙНЫХ СУХИХ

На основе данных, полученных в главе 3, были сконструированы экспериментально-производственные серии наборов реагентов с полностью лиофилизированным составом: «Диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый сухой» («ДЭТ-Иг») и «Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный сухой» («ДЭТ-Аг»).

4.1 Изучение стабильности функциональных характеристик лиофилизированных форм выпуска эритроцитарных препаратов

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

При этом одним из основных критериев изучения стабильности являлось хранение образцов не только в первичной упаковке промышленного выпуска, но и исследование стабильности после первого вскрытия упаковки, в период использования восстановленного препарата.

Для обоснования срока годности и рекомендуемых условий хранения при использовании наборов реагентов проводили изучение стабильности основных показателей качества «ДЭТ-Иг» и «ДЭТ-Аг». Для каждой постановки контрольных испытаний использовали по 3 образца каждой серии. За образец принимали содержимое одного набора. По завершению каждого временного интервала испытуемые образцы извлекали из холодильника, выдерживали при комнатной температуре (18-25 °С) не менее (30±5) мин и исследовали по физико-химическим и иммунобиологическим параметрам.

Способность препаратов сохранять свои свойства в течение срока годности при соблюдении условий хранения и транспортировки обеспечивает надлежащее качество, диагностическую эффективность и их безопасность на всех этапах жизненного цикла. Срок годности устанавливают экспериментально при хранении в течение определенного времени в условиях и упаковке, регламентируемых нормативной документацией. Одним из используемых является метод «ускоренного старения», позволяющий рассчитать сроки хранения при различных температурах и сделать прогноз срока годности готового изделия.

Экспериментальные образцы эритроцитарных препаратов выдерживали при температуре (27 ± 1) °С в течение 116 сут, (37 ± 1) °С в течение 47 сут, согласно методике, описанной в ОФС 1.1.0009.18 [85]. Контрольные исследования проводили с интервалом 15 дней для температуры (27 ± 1) °С, 10 дней – для температуры (37 ± 1) °С. Для вычисления срока годности (С) использовали формулу зависимости Вант-Гоффа (2):

$$C = K \times C_3 \quad (2)$$

где К – коэффициент соответствия;
 C_3 – экспериментальный срок годности, сут.

Для расчета коэффициента соответствия (К) применяли формулу (3):

$$K = A^{\frac{t_3 - t_{xp}}{10}} \quad (3)$$

где t_{xp} – температура хранения, °С;
 t_3 – температура экспериментального хранения, °С;
 А – температурный коэффициент скорости химической реакции (принят равным 2,5).

Сводные данные представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты расчета экспериментального срока годности (С)

Рекомендуемая температура хранения (t_{xp}), °С	Экспериментальная температура хранения (t_3), °С	Экспериментальный срок хранения (C_3), сут	Коэффициент соответствия (К)	Срок годности (С), сут
5±3	27±1	116	6,3	730,8
	37±1	47	15,6	733,2

По полученным результатам установлено, что препараты стабильно сохраняли все физико-химические показатели независимо от температуры и временного интервала во всех испытываемых сериях.

Результаты испытаний иммунобиологических показателей набора реагентов «ДЭТ-Иг» показали, что выявление гомологичных штаммов составило 100 %, с аналитической чувствительностью $7,8 \times 10^5$ - $3,12 \times 10^6$ м.к./мл макрометодом и $1,56 \times 10^6$ - $6,25 \times 10^6$ м.к./мл микрометодом, независимо от условий и продолжительности хранения образцов. Также была подтверждена высокая специфичность при отсутствии перекрестных реакций с гетерологичными микроорганизмами.

При исследовании набора реагентов «ДЭТ-Аг» отмечено сохранение всех заданных показателей. Набор выявлял в РНГА специфические антитела в гомологичной сыворотке 1:20000-1:80000 – макрометодом и 1:10000-1:40000 – микрометодом. При исследовании специфичности не было зарегистрировано положительных результатов в РНГА с гетерологичными сыворотками.

Таким образом, на основании данных, полученных в ускоренных испытаниях, можно рекомендовать срок годности наборов реагентов «ДЭТ-Аг» и «ДЭТ-Иг» в течение двух лет. Экспериментально доказано, что в течение этого периода времени качественные показатели препаратов остаются на уровне, соответствующем требованиям нормативной документации.

Данные, полученные с использованием метода «ускоренного старения», должны быть подкреплены изучением стабильности в условиях долгосрочных испытаний в течение всего заявленного срока годности. Для этого контрольные исследования экспериментальных серий наборов реагентов при хранении в потребительской упаковке с учетом регламентированной температуры (5 ± 3) °С проводили через каждые три месяца в течение первого года хранения и шести месяцев в течение заявленного периода испытаний [85].

Установлено, что все образцы сохраняли стабильность в течение 24 месяцев наблюдения. По окончании 30 месяцев хранения при указанной температуре во многих образцах наблюдалось снижение аналитической чувствительности в 2 и более раза, что не соответствовало нормативной документации на данные препараты. Результаты испытаний при установлении срока годности долгосрочным методом представлены на рисунках 14 и 15 и в таблице 10.

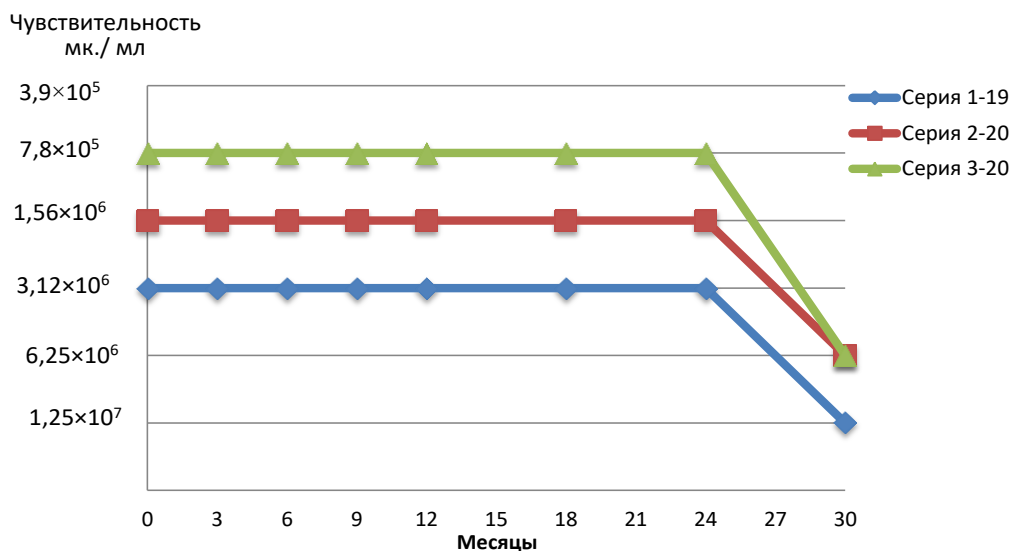


Рисунок 14 – Изменение показателей аналитической чувствительности набора реагентов «ДЭТ-Иг» (макрометод) в зависимости от срока хранения (месяцы) при температуре (5 ± 3) °С.

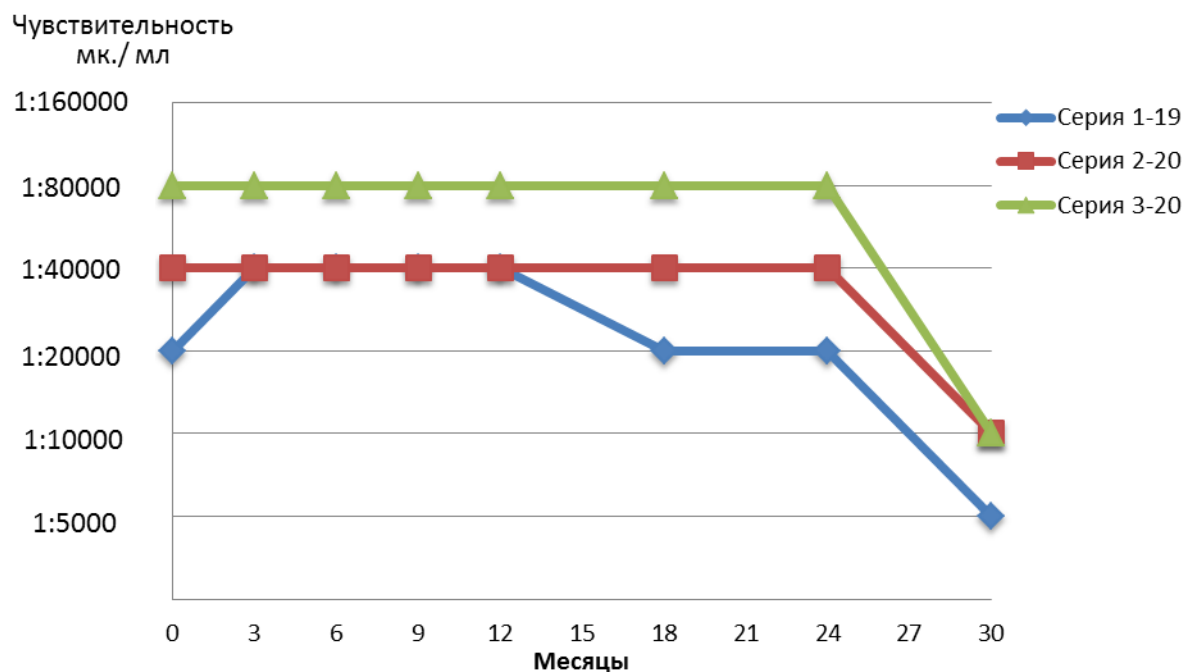


Рисунок 15 – Изменение показателей аналитической чувствительности набора реагентов «ДЭТ-Аг» (макрометод) в зависимости от срока хранения (месяцы) при температуре (5 ± 3) °С.

Таблица 10 – Критерии стабильности лиофилизированных препаратов при установлении срока годности долгосрочным методом

Наименование набора	№ серии, дата изгот.в.	Температура хранения	Периодичность контроля (месяцы)	Критерии стабильности				
				Внешний вид	Растворимость	Аналитическая чувствительность		Аналитическая специфичность
						макро	микро	
Набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый сухой» («ДЭТ-Иг»)	1-19 11.12.19 г.	(5±3) °С	0	+	+	+	+	+
			3	+	+	+	+	+
			6	+	+	+	+	+
	2-20 15.01.20 г.		9	+	+	+	+	+
			12	+	+	+	+	+
			18	+	+	+	+	+
			24	+	+	+	+	+
3-20 23.01.20 г.	30	+	+	±	±	–		
Набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный сухой» («ДЭТ-Аг»)	1-19 16.12.19 г.	(5±3) °С	0	+	+	+	+	+
			3	+	+	+	+	+
			6	+	+	+	+	+
	2-20 20.01.20 г.		9	+	+	+	+	+
			12	+	+	+	+	+
			18	+	+	+	+	+
			24	+	+	+	+	+
3-20 04.02.20 г.	30	+	+	±	±	–		

Примечание:

«+» – критерий стабилен;

«±» – критерий сомнителен;

«–» – исследования не проводились.

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 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$, $(25\pm 4)^\circ\text{C}$ и пониженных температур – минус $(5\pm 1)^\circ\text{C}$, $(18\pm 1)^\circ\text{C}$, $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ и при хранении после вскрытия компонентов набора в процессе использования в условиях температуры $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ через каждые 24 ч хранения. Результаты испытаний представлены в таблицах 11 и 12.

Из данных таблицы 11 видно, что хранение наборов реагентов при имитации транспортирования при температурах от минус 37°C до 37°C в течение 30 сут не оказывало отрицательного воздействия на стабильность физико-химических и иммунобиологических показателей препаратов, на 31 сут при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ было отмечено снижение аналитической чувствительности наборов реагентов в 2 раза.

Из данных таблицы 12 установлено, что все испытуемые образцы после растворения при температуре хранения $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ сохраняли стабильность без изменения внешнего вида, аналитической чувствительности и специфичности в течение 8 сут наблюдения. По окончании 9 сут хранения при указанной температуре во всех образцах наблюдалось изменение внешнего вида взвеси *F. tularensis* инактивированной, проявляющееся в помутнении раствора с образованием осадка на дне ампулы.

Способность наборов реагентов сохранять свои свойства в течение срока годности при соблюдении условий хранения и транспортирования обеспечивает надлежащее качество, диагностическую эффективность и их безопасность на всех этапах жизненного цикла.

Таблица 11 – Критерии стабильности лиофилизированных наборов реагентов при имитации условий транспортирования

Наименование набора	№ серии, дата изгот.в.	Температура хранения	Периодичность контроля (сутки)	Критерии стабильности				
				Внешний вид	Растворимость	Аналитическая чувствительность		Аналитическая специфичность
						макро	микро	
Набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый сухой» («ДЭТ-Иг»)	2-20 15.01.20 г.	минус (37±1) °С	1-30	+	+	1,56×10 ⁶	3,12×10 ⁶	+
		минус (18±1) °С						
		минус (5±1) °С						
		(25±4) °С						
		(37±1) °С						
		(37±1) °С	31	+	+	3,12×10 ⁶	6,25×10 ⁶	–
Набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный сухой» («ДЭТ-Аг»)	2-20 20.01.20 г.	минус (37±1) °С	1-30	+	+	1:40000	1:20000	+
		минус (18±1) °С						
		минус (5±1) °С						
		(25±4) °С						
		(37±1) °С						
		(37±1) °С	31	+	+	1:20000	1:10000	–

Примечание:

«+» – критерий стабилен;

«-» – исследования не проводились.

Таблица 12 – Критерии стабильности лиофилизированных препаратов при хранении после вскрытия компонентов набора в процессе использования

Наименование набора	№ серии, дата изгот.в.	Температура хранения	Периодичность контроля (сутки)	Критерии стабильности			
				Внешний вид	Аналитическая чувствительность		Аналитическая специфичность
					макро	микро	
Набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый сухой» («ДЭТ-Иг»)	2-20 15.01.20 г.	(5±3) °С	1	+	+	+	+
			2	+	+	+	+
			3	+	+	+	+
			4	+	+	+	+
			5	+	+	+	+
			6	+	+	+	+
			7	+	+	+	+
			8	+	+	+	+
			9	±	–	–	–
Набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный сухой» («ДЭТ-Аг»)	2-20 20.01.20 г.	(5±3) °С	1	+	+	+	+
			2	+	+	+	+
			3	+	+	+	+
			4	+	+	+	+
			5	+	+	+	+
			6	+	+	+	+
			7	+	+	+	+
			8	+	+	+	+
			9	±	–	–	–

Примечание:

«+» – критерий стабилен;

«±» – критерий сомнителен;

«–» – исследования не проводились.

На основании проведенных исследований составлены и оформлены в соответствии с требованиями методические рекомендации «Методы определения стабильности основных функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики *in vitro*: долговечность при хранении, стабильность при транспортировании и при использовании» (одобрены решением Ученого совета ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора 01.07.2021, протокол № 6, утверждены директором института 01.07.2021). В методических рекомендациях описаны общие требования к оценке стабильности в реальном времени и ускоренным методом при использовании вышеуказанных МИ ИВД.

4.2 Контроль и определение диагностической ценности набора реагентов диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового сухого

В состав экспериментального набора реагентов «ДЭТ-Иг» входят: диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый 10 % сухой (лиофилизированные в среде высушивания формализированные эритроциты барана, сенсibilизированные туляремийными иммуноглобулинами); положительный контрольный образец инактивированный (K^+) сухой (взвесь туляремийного микроба инактивированная сухая *F. tularensis* 15 НИИЭГ в концентрации 1×10^9 м.к./мл) и сыворотка диагностическая туляремийная сухая в разведении 1:10.

Контроль качества набора производили по физико-химическим (внешний вид, растворимость, цветность, потеря в массе при высушивании) и иммунобиологическим (аналитическая чувствительность и аналитическая специфичность) показателям, представленным в таблице 13.

Таблица 13 – Физико-химические и иммунобиологические показатели набора реагентов «ДЭТ-Иг»

Наименование продукта	Внешний вид	Растворимость/ Внешний вид при стоянии	Потеря в массе при высушивании	Аналитическая чувствительность	Аналитическая специфичность
Диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый 10 % сухой	Аморфная масса коричневого цвета	В течение 30-40 сек содержимое ампулы полностью растворялось в 1,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, образуя однородную взвесь коричневого цвета. При стоянии формировалось 2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, разбивающийся при встряхивании.	2,5 %	Набор выявляет гомологичные штаммы в концентрации $3,12 \times 10^6$ м.к./мл макрометодом и $6,25 \times 10^6$ м.к./мл микрометодом	Набор не выявляет гетерологичные штаммы в концентрации 1×10^8 м.к./мл
Положительный контрольный образец инактивированный (K^+) сухой	Аморфная масса беловатого цвета	В течение 30-40 сек содержимое ампулы полностью растворялось в 1,0 мл дистиллированной воды, образуя прозрачную бесцветную жидкость.	2,4 %		
Сыворотка диагностическая туляремийная сухая	Аморфная масса беловатого цвета	В течение 30-40 сек содержимое ампулы полностью растворялось в 1,0 мл дистиллированной воды, образуя прозрачную бесцветную жидкость.	2,7 %	—	

Для подтверждения диагностической ценности набора реагентов «ДЭТ-Иг» проведены исследования на полевом материале, отобранном в 2020 г. и 2022 г. из природных очагов туляремии в Ставропольском крае (Петровский, Шпаковский, Кировский, Советский, Минераловодский, Георгиевский районы) и во время вспышки туляремии в Ставропольском крае (Петровский округ) в 2022 г. В работе было апробировано 73 пробы: экскременты мышевидных грызунов, погадки хищных птиц, помет хищных млекопитающих, мумифицированный труп полевки, органы павших животных, вода.

Подготовку к исследованию проб проводили согласно разработанной эксплуатационной документации к препаратам и СанПиН 3.3686-21 [133]. Постановку осуществляли с помощью РНГА и реакции торможения непрямо́й гемагглютинации (РТНГА) макро- и микрометодами, без применения специальной разводящей жидкости, используя 0,9 % раствор натрия хлорида рН (6,2±0,2), в 2-х повторностях.

Диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый разводили 0,9 % раствором натрия хлорида до 2,5 % для макрометода и 0,5 % для микрометода. Положительный контроль использовали в концентрации $5,0 \times 10^7$ м.к./мл, сыворотку туляремийную для РТНГА – в разведении 1:500.

В результате в 19 пробах из 21 положительной подтвержденных в ИФА-МИС и полимеразной цепной реакции (ПЦР), был обнаружен антиген возбудителя туляремии, что составило 90 % диагностической чувствительности. Результаты РНГА представлены в таблице 14. Диагностическая специфичность составила 96 %, так как из 52 проб, в которых отсутствовал возбудитель (по результатам ИФА-МИС и ПЦР), в 50 – был отрицательный результат.

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.

Таблица 14 – Результаты серологического исследования полевого материала в РНГА (микрометод) (выборочно)

№ пробы	Дата сбора	Адрес сбора	Вид пробы	Результаты исследования «ДЭТ-Иг»	
				РНГА	РТНГА
1	2	3	4	5	6
Положительные пробы в ПЦР и ИФА-МИС					
1	14.01.20	СК, Петровский район, с. Рогатая Балка	Экскременты полевков	1:32	1:4
2	14.01.20	СК, Петровский район, с. Рогатая Балка	Погодка хищной птицы	1:32	1:4
55	24.03.22	СК, Шпаковский район, п. Приозерный	Селезенка (полевка обыкновенная)	1:32	1:4
56	26.03.22	СК, Шпаковский район, п. Приозерный	Селезенка (полевка обыкновенная)	1:32	–
57	26.03.22	СК, Шпаковский район, п. Приозерный	Селезенка (полевка обыкновенная)	1:64	1:4
58	26.03.22	СК, Шпаковский район, п. Приозерный	Смыв с грудной полости (полевка обыкновенная)	1:32	–
59	26.03.22	СК, Шпаковский район, п. Приозерный	Смыв с грудной полости (полевка обыкновенная)	1:16	–
60	26.03.22	СК, Шпаковский район, п. Приозерный	Селезенка (мышь малая лесная)	1:64	1:4
61	26.03.22	СК, Шпаковский район, п. Приозерный	Селезенка (мышь малая лесная)	1:32	–
62	26.03.22	СК, Шпаковский район, п. Приозерный	Смыв с грудной полости (мышь малая лесная)	1:64	1:16
63	27.03.22	СК, Шпаковский район, п. Приозерный	Смыв с грудной полости (Полевка обыкновенная)	1:32	–
64	29.03.22	СК, Шпаковский район, п. Приозерный	Смыв с грудной полости (мышь малая лесная)	1:64	1:4
65	26.10.22	СК, Шпаковский район, п. Приозерный	Селезенка (полевка обыкновенная)	1:64	1:8
66	26.10.22	СК, Шпаковский район, п. Приозерный	Селезенка (полевка обыкновенная)	1:128	1:16
67	26.10.22	СК, Шпаковский район, п. Приозерный	Селезенка (полевка обыкновенная)	1:64	1:8
68	11.11.22	СК, Петровский р-н, с. Сухая Буйвола, каптаж до хлорирования «Леденевка»	Вода	1:16	–
69	11.11.22	СК, Петровский район, с. Сухая Буйвола, окрестности каптажа «Известка»	Смыв с грудной полости (полевка обыкновенная)	1:64	1:8
70	11.11.22	СК, Петровский район, окрестности каптажа «Талый»	Смыв с грудной полости (полевка обыкновенная)	1:64	1:16

1	2	3	4	5	6
71	12.11.22	СК, Петровский р-н, с. Сухая Буйвола, около каптажа «Дурнуш»	Вода	–	–
72	12.11.22	СК, Петровский район, каптаж «Талый»	Селезенка (полевка обыкновенная)	1:128	1:16
73	12.11.22	СК, Петровский район, с. Сухая Буйвола, каптаж «Круглый»	Селезенка (мышь малая лесная)	–	–
Отрицательные пробы в ПЦР и ИФА-МИС					
3-5, 7-53	январь, март, июль 2020	СК, Петровский район, с. Рогатая Балка и с. Донская Балка; СК, Георгиевский район, ст. Георгиевская и с. Обиль; СК, Кировский район, ст. Марьинская и ст. Советская; СК, Советский район, с. Правокумское; СК, Минераловодский район, с. Левокумка, с. Марьины Колодцы и с. Сунжа	Погадки хищных птиц, экскременты зайцев, помет хищных млекопитающих, мумифицированный труп полевки, экскременты полевок	–	–
6	27.03.20	СК, Георгиевский район, с. Обильное	Помет хищного млекопитающего	1:16	–
54	22.03.22	СК, Шпаковский район, п. Приозерный	Селезенка (мышь степная)	1:16	–

Примечание: «–» – отрицательный контроль в виде «пуговки».

4.3 Контроль и определение диагностической ценности набора реагентов диагностикума эритроцитарного туляремийного антигенного сухого

Сконструированный экспериментальный набор реагентов «ДЭТ-Аг», в состав которого входит: диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный 10 % сухой (лиофилизированные в среде высушивания формализированные эритроциты барана, сенсibilизированные водорастворимым антигеном туляремийного микроба); 50 % формализированные эритроциты барана сухие (эритроциты барана, стабилизированные формалином и лиофилизированные в среде высушивания); положительный контрольный образец инактивированный (K⁺) сухой (сыворотка

туляремию (1:10), взвесь туляремию микроба инактивированная сухая (*F. tularensis* 15 НИИЭГ в концентрации 1×10^9 м.к./мл) контролировали по параметрам, представленным в таблице 15.

Оценку диагностической ценности набора реагентов «ДЭТ-Аг» проводили на клиническом материале (сыворотки крови), полученные от людей: больных (7 образцов), вакцинированных против туляремии (22 образца) и не болевших ранее туляремией и не вакцинированных против нее (20 образцов). Работу с клиническим материалом проводили согласно разработанной эксплуатационной документации к препаратам и МУК 4.2.2939-11 [76].

Исследуемые сыворотки крови разводили 0,9 % раствором натрия хлорида 1:10, инактивировали прогреванием в водяной бане в течение 30 мин при температуре (56 ± 1) °С и адсорбировали 50 % формализованными эритроцитами барана из расчета 0,1 мл эритроцитов на 1,0 мл исследуемого материала. Смесь перемешивали и выдерживали при температуре (37 ± 1) °С в течение $(1,5 \pm 0,5)$ ч или при температуре (5 ± 3) °С в течение (19 ± 1) ч для удаления гетерологичных гемагглютинирующих антител сыворотки. Надосадочную жидкость использовали для анализа.

Постановку осуществляли так же с помощью РНГА и РТНГА макро- и микрометодами, без применения специальной разводящей жидкости, используя 0,9 % раствор натрия хлорида рН $(6,2 \pm 0,2)$, в 2-х повторностях.

Разведения диагностикума осуществляли аналогично, как для набора реагентов «ДЭТ-Иг». Положительный контрольный образец использовали в разведении 1:2500. Взвесь *F. tularensis* для РТНГА – в концентрации $5,0 \times 10^8$ м.к./мл.

Таблица 15 – Физико-химические и иммунобиологические показатели набора реагентов «ДЭТ-Аг»

Наименование продукта	Внешний вид	Растворимость/ Внешний вид при стоянии	Потеря в массе при высушивании	Аналитическая чувствительность	Аналитическая специфичность
Диагностикум эритроцитарный туляремиальный антигенный 10 % сухой	Аморфная масса коричневого цвета	В течение 30-40 сек содержимое ампулы полностью растворялось в 1,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, образуя однородную взвесь коричневого цвета. При стоянии формировалось 2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, разбивающийся при встряхивании.	2,3 %	Выявляет в РНГА 1:40000 для макрометода и 1:20000 для микрометода	Отсутствовали перекрестные реакции с гетерологичными сыворотками
Положительный контрольный образец инактивированный (K+) сухой	Аморфная масса беловатого цвета	В течение 30-40 сек содержимое ампулы полностью растворялось в 1,0 мл дистиллированной воды, образуя прозрачную бесцветную жидкость.	2,6 %		
Взвесь <i>F. tularensis</i> , инактивированная сухая	Аморфная масса беловатого цвета	В течение 30-40 сек содержимое ампулы полностью растворялось в 1,0 мл дистиллированной воды, образуя прозрачную бесцветную жидкость.	2,5 %	–	
Эритроциты барана формализированные сухие 50 %	Аморфная масса коричневого цвета	В течение 30-40 сек содержимое флакона полностью растворялось в 2,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, образуя однородную взвесь коричневого цвета. При стоянии формировалось 2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, разбивающийся при встряхивании.	2,1 %	–	–

Полученные результаты представлены в таблице 16. Было установлено, что диагностическая чувствительность набора реагентов «ДЭТ-Аг» на клиническом материале составила 93 % (из 29 проб сывороток, подтвержденных методом ИФА и РА, 27 были положительными). Диагностическая специфичность – 90 % (гемагглютинация не наблюдалась в 18 пробах из 20 (по результатам ИФА и РА).

Таблица 16 – Результаты серологического исследования клинического материала в РНГА (микрометод) (выборочно)

Наименование образца	Дата забора	Наименование организации	Результаты исследования «ДЭТ-Аг»	
			РНГА	РТНГА
1	2	3	4	5
Сыворотки, полученные от вакцинированных людей				
Сыворотка № 1 (ревакцинация 19.03.2019)	28.04.21	ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора	1:40	–
Сыворотка № 2 (вакцинация 02.12.2020)			1:640	1:80
Сыворотка № 3 (вакцинация 20.07.2020)			1:1280	1:80
Сыворотка № 4 (вакцинация 20.09.2020)			1:320	1:40
Сыворотка № 5 (ревакцинация 20.07.2020)			1:640	1:80
Сыворотка № 6 (ревакцинация 20.09.2020)			1:160	1:40
Сыворотка № 7 (вакцинация 17.12.2020)			1:640	1:160
Сыворотка № 8 (вакцинация 02.12.2020)			1:160	1:20
Сыворотка № 9 (вакцинация 02.12.2020)			1:320	1:40
Сыворотка № 10 (вакцинация 19.03.2019)			1:80	1:20
Сыворотка № 11 (вакцинация 02.12.2020)			1:640	1:160
Сыворотка № 12 (вакцинация 17.12.2020)			1:160	1:20
Сыворотка № 13 (ревакцинация 19.03.2019)			1:160	1:40
Сыворотка № 14 (вакцинация 17.12.2020)			–	–
Сыворотка № 15 (вакцинация 20.07.2020)			1:640	1:160
Сыворотка № 16 (вакцинация 20.07.2020)			1:160	1:40
Сыворотка № 17 (ревакцинация 20.09.2020)			1:640	1:160

Продолжение таблицы 16

1	2	3	4	5
Сыворотка № 18 (вакцинация 17.12.2020)	28.04.21	ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора	1:640	1:80
Сыворотка № 19 (вакцинация 17.12.2020)			1:1280	1:80
Сыворотка № 20 (вакцинация 20.09.2020)			1:640	1:80
Сыворотка № 21 (вакцинация 02.12.2020)			–	–
Сыворотка № 22 (вакцинация 19.03.2019)			1:320	–
Сыворотки, полученные от больных туляремией людей				
Сыворотка № 43	11.11.22	Инфекционная больница № 5 (Петровский район, Ставропольский край)	1:640	–
Сыворотка № 44			1:1280	–
Сыворотка № 45			1:1280	–
Сыворотка № 46			1:320	–
Сыворотка № 47			1:320	1:20
Сыворотка № 48	8.12.22		1:1280	–
Сыворотка № 49			1:320	1:20
Сыворотки, полученные от людей, не болевших ранее туляремией и не вакцинированных против нее				
Сыворотки №№ 23-34,36	28.04.21	ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора	–	–
Сыворотка № 35			1:160	1:40
Сыворотки №№ 37-39	22.05.21		–	–
Сыворотки №№ 40,42	19.05.22		–	–
Сыворотка № 41			1:320	1:40

Примечание: «–» – отрицательный контроль в виде «пуговки».

Таким образом, в ходе испытаний было установлено соответствие набора реагентов «ДЭТ-Аг» назначению, а именно: для анализа сывороток крови человека на наличие специфических антител к *F. tularensis* в РНГА.

Можно сделать вывод о том, что благодаря простоте и достаточно высокой чувствительности, возможности хранения и транспортирования в большом диапазоне температур, разработанные лиофилизированные наборы реагентов «ДЭТ-Иг» и «ДЭТ-Аг» можно использовать при расследовании вспышек туляремии в полевых условиях без наличия специального оборудования.

Обработку и статистический анализ данных, представленных в таблицах 17 и 18, 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 $p < 0,05$.

Чувствительность, специфичность и точность рассчитывали по следующим формулам (5), (6), (7):

$$\text{Чувствительность} = \frac{\text{ИП}}{(\text{ИП} + \text{ЛО})} \quad (5)$$

$$\text{Специфичность} = \frac{\text{ИО}}{(\text{ИО} + \text{ЛП})} \quad (6)$$

$$\text{Точность} = \frac{(\text{ИП} + \text{ИО})}{(\text{ИП} + \text{ИО} + \text{ЛП} + \text{ЛО})} \quad (7)$$

где ИП – истинно положительный результат;
 ИО – истинно отрицательный результат;
 ЛП – ложноположительный результат;
 ЛО – ложноотрицательный результат.

Таблица 17 – Статистический анализ с использованием языка R (версия 4.0.2) результатов испытания «ДЭТ-Иг»

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

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 %).

Таблица 18 – Статистический анализ с использованием языка R (версия 4.0.2) результатов испытания «ДЭТ-Аг»

Результат «ДЭТ-Аг»	Результат эталонных методов (РА и ИФА)	
	Положительный	Отрицательный
Положительный	27	2
Отрицательный	2	18

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 19.

Таблица 19 – 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 наборов реагентов диагностикумов эритроцитарных туляремиальных, свидетельствуют о том, что эти методы позволяют получить близкие по значимости результаты при обнаружении антигена в биологическом материале, объектах окружающей среды и специфических антител в сыворотках животных и людей больных, переболевших, вакцинированных против туляремии.

С учётом подтверждённой в данной работе перспективности применения разработанных лиофилизированных наборов реагентов диагностикумов эритроцитарных туляремиальных оформлены нормативные документы: лабораторные регламенты на наборы реагентов «ДЭТ-Иг» и «ДЭТ-Аг», проекты технических условий, инструкций по применению и маркировок первичных и вторичных упаковок.

ГЛАВА 5. ПРОВЕДЕНИЕ МЕНЕДЖМЕНТА РИСКОВ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДИАГНОСТИКУМОВ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ ТУЛЯРЕМИЙНЫХ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ

Разработанные наборы реагентов «ДЭТ-Аг» и «ДЭТ-Иг», предназначенные для диагностики туляремии и индикации её возбудителя в РНГА, относятся к 3 классу потенциального риска применения наборов, в связи с чем, согласно Постановлению правительства РФ от 9 февраля 2022 г. № 136 [82], необходимо проведение менеджмента рисков на всех этапах жизненного цикла медицинских изделий (МИ).

Область применения набора «ДЭТ-Аг» – клиническая лабораторная диагностика, «ДЭТ-Иг» – санитарно-эпидемиологические и научные исследования.

5.1 Мониторинг и контроль над рисками

Управление рисками для качества, как правило, состоит из 5 последовательных подпроцессов: идентификации возможных опасностей, связанных с производством и использованием МИ; проведения анализа рисков, качественной и количественной оценки рисков, возникающих в результате опасностей; управления рисками; оценки результативности управления; отчета и совокупности записей по менеджменту рисков [9, 39, 129].

Менеджмент рисков проводили в рамках научных исследований по разработке биотехнологии получения наборов реагентов: «ДЭТ-Иг» и «ДЭТ-Аг» в соответствии с требованиями ГОСТ ISO 14971-2021 [29] с использованием стандартизованного метода анализа видов и последствий потенциальных отказов (FMEA) [124]. FMEA методически разделяет анализ сложных процессов на стадии, которыми можно управлять. FMEA также

применим к оборудованию и помещениям, для анализа технологических операций и их влияния на продукцию или процесс.

Менеджмент рисков применяли на всех стадиях жизненного цикла продукции, включающего производство, контроль, хранение и транспортировку готового продукта, использование в практике и утилизацию. Для проведения процесса менеджмента рисков была организована экспертная группа, включающая руководителя лаборатории биологического и технологического контроля (ЛБТК) ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора и специалистов, обладающих специальными техническими знаниями, касающихся конкретного МИ (особенностей производства, технологических процессов и контроля качества диагностического набора).

Выявление потенциальных опасностей осуществляли на основе анализа работы с подобными видами МИ, учитывая собственный опыт изготовителя, нашедший отражение в технической и эксплуатационной документации. Это позволило выявить и идентифицировать риски, включая те из них, которые уже находятся под управлением [137].

Идентификацию рисков, связанных с производством и контролем наборов реагентов «ДЭТ-Иг» и «ДЭТ-Аг», проводили с использованием разработанных и утвержденных в установленном порядке опытно-промышленных регламентов (ОПР) и стандартных операционных процедур (СОП), а также производственных записей. Анализировали общие блок-схемы технологических процессов и разделы технологического контроля.

В разделе контроля ОПР приведен перечень важнейших контрольных точек (К) производства, влияющих на качество конечного продукта и обеспечивающих соблюдение установленного технологического режима.

В понятие контрольной точки включены наименование стадии или операции производства и объекта контроля. Каждая контрольная точка указана с приведением наименования контролируемого показателя.

Биотехнология производства набора реагентов «ДЭТ-Аг» состоит из 6 технологических процессов (ТП), каждый из которых включает ряд операций

подготовительных и вспомогательных работ (ВР). Операции ВР в технологических процессах с ничтожно малой вероятностью возникновения опасностей, в анализе не учитывались. Блок-схема производства и контрольные критические точки представлены на рисунке 16 и в таблице 20.

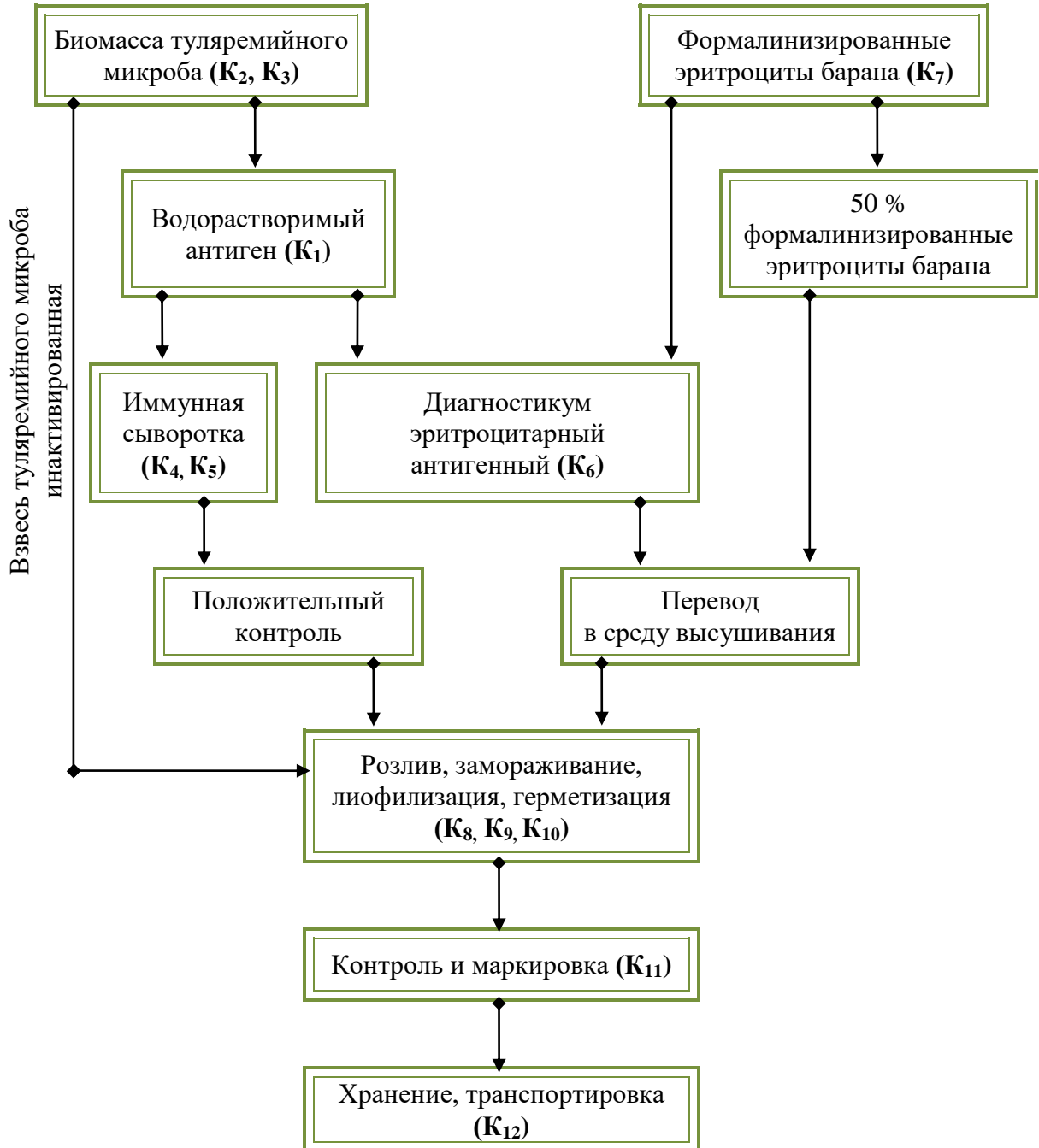


Рисунок 16 – Блок-схема производства набора реагентов «ДЭТ-Аг»

В результате анализа производства «ДЭТ-Аг» были выделены 12 критических контрольных точек (К) по каждому отдельно учитываемому опасному фактору (таблица 20).

Таблица 20 – Контрольные критические точки на стадии производства «ДЭТ-Аг»

Стадия технологического процесса	Контрольная критическая точка	Опасный фактор
1	2	3
ТП-1 Получение антигена туляремийного микроба	К ₁	Отсутствие специфической активности
ВР-1.1 Выращивание биомассы	К ₂	Наличие живых бактерий туляремийного микроба
ВР-1.2 Стерилизация биомассы	К ₃	
ТП-2 Получение агглютинирующей сыворотки	К ₄	Отсутствие специфической активности сыворотки
ВР-2.1 Подбор животных-продуцентов	К ₅	Болезнь/Гибель животных
ТП-3 Получение диагностикума эритроцитарного	К ₆	Отсутствие чувствительности и специфичности
ВР-3.1 Получение формализированных эритроцитов	К ₇	Отсутствие гомогенности Спонтанное склеивание эритроцитов
ТП-4 Лиофилизация	К ₈	Параметры лиофилизации (вакуум, температура полки, препарата, конденсатора)
ВР-4.1 Розлив диагностикумов и 50% формализированных эритроцитов в ампулы и флаконы	К ₉	Возможность контаминации
ВР-4.2 Герметизация ампул и флаконов с препаратами	К ₁₀	Разгерметизация ампул и флаконов
ТП-5 Маркировка и упаковка	К ₁₁	Текст маркировки Целостность упаковки Нарушение комплектности
ТП-6 Хранение, транспортировка	К ₁₂	Температурный режим

Примечание: ТП – технологический процесс; ВР – вспомогательные работы.

Биотехнология производства набора реагентов «ДЭТ-Иг» состоит из 7 технологических процессов (ТП), включающих подготовительные и вспомогательные работы (ВР). Блок-схема производства и контрольные критические точки представлены на рисунке 17 и в таблице 21.

В результате анализа производства «ДЭТ-Иг» были выделены 13 критических контрольных точек (К) по каждому отдельно учитываемому опасному фактору.

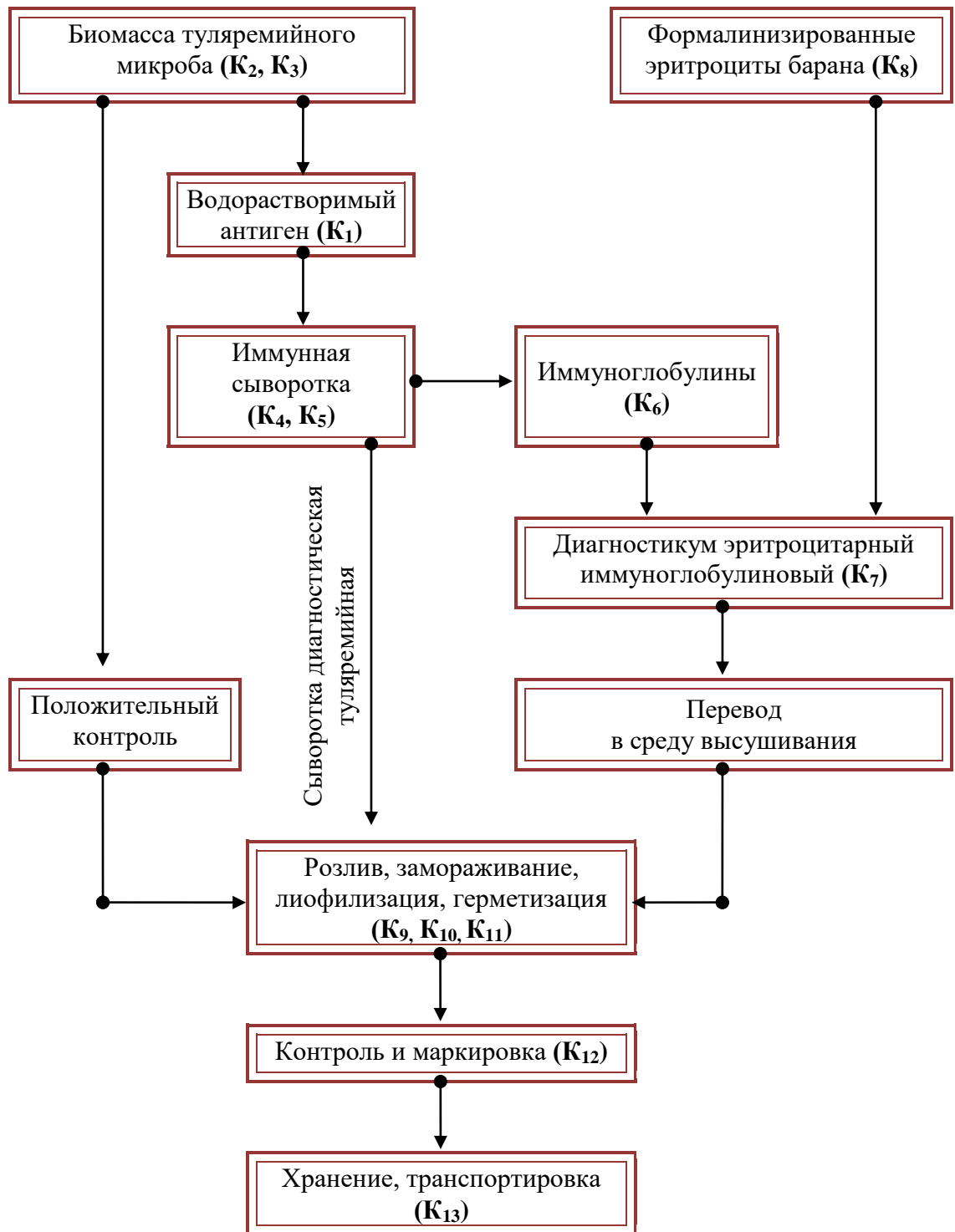


Рисунок 17 – Блок-схема производства набора реагентов «ДЭТ-Иг»

Рисковые ситуации присутствуют на всех этапах производственного процесса. Нарушения в выделенных контрольных критических точках оказывают существенное влияние на выполнение установленных требований производства, качество и безопасность готового продукта в целом.

Таблица 21 – Контрольные критические точки на стадии производства «ДЭТ-Иг»

Стадия технологического процесса	Контрольная критическая точка	Опасный фактор
1	2	3
ТП-1 Получение антигена туляремиального микроба	K ₁	Отсутствие специфической активности
ВР-1.1 Выращивание биомассы	K ₂	Наличие живых бактерий туляремиального микроба
ВР-1.2 Стерилизация биомассы	K ₃	
ТП-2 Получение агглютинирующей сыворотки	K ₄	Отсутствие специфической активности сыворотки
ВР-2.1 Подбор животных-продуцентов	K ₅	Болезнь/Гибель животных
ТП-3 Получение иммуноглобулинов	K ₆	Отсутствие специфичности иммуноглобулинов
ТП-4 Получение диагностикума эритроцитарного	K ₇	Отсутствие чувствительности и специфичности
ВР-4.1 Получение формализированных эритроцитов	K ₈	Отсутствие гомогенности Спонтанное склеивание эритроцитов
ТП-5 Лиофилизация	K ₉	Параметры лиофилизации (вакуум, температура полки, препарата, конденсатора)
ВР-5.1 Розлив диагностикумов в ампулы	K ₁₀	Возможность контаминации
ВР-5.2 Герметизация ампул с препаратами	K ₁₁	Разгерметизация ампул и флаконов
ТП-6 Маркировка и упаковка	K ₁₂	Текст маркировки Целостность упаковки Нарушение комплектности
ТП-7 Хранение, транспортировка	K ₁₃	Температурный режим

Примечание: ТП – технологический процесс; ВР – вспомогательные работы.

В результате 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».

Рисковые ситуации, которые могут возникнуть при хранении и транспортировании, анализировали на основе протоколов и отчетов по изучению

стабильности МИ при установлении срока годности и имитации условий транспортирования.

Минимизация выявленных рисков может быть реализована внесением соответствующей информации в проект маркировки первичной и вторичной упаковок, но также будет способствовать и возникновению новых рисков.

Упаковка и маркировка являются важными элементами производства препаратов. Значительное количество предъявляемых претензий и последующих отзывов продукции с рынка связано с ошибками и несоответствиями в процессе упаковки. Неоднозначность и неточность формулировок в маркировке и инструкции по применению могут привести к последствиям разной степени серьезности для потребителя. Анализ записей, подтверждающих выполнение контроля процесса упаковки и выявление опасных факторов на этом этапе, в свою очередь минимизирует возникновение опасностей при использовании препарата в специализированной лаборатории.

Учитывая, что производство и контроль рассматриваемых препаратов связаны с использованием микроорганизмов II группы патогенности, а использование 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 мониторингованных 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». 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. Уровень опасности и вероятность возникновения каждого опасного фактора оценивали по пятибалльной шкале. В соответствии со шкалами выставлены экспертные оценки определения приемлемости или неприемлемости рисков. Оценку опасности (S) располагали в порядке возрастания риска (таблица 22), а уровни вероятности (P) в матрице установлены в порядке убывания (таблица 23).

Таблица 22 – Степень тяжести возможных последствий риска

Опасность (S)		
Очень небольшая	1	Несоответствие препарата установленным требованиям, которое может вызвать трудности или временные неудобства
Малая	2	Несоответствие препарата установленным требованиям, которое не вызывает прямого негативного влияния на физическое здоровье потребителя (пациента), но может причинить существенный физический или психологический дискомфорт
Серьезная	3	Несоответствие препарата установленным требованиям, которое может привести к ненадлежащему лечению потребителя (пациента)
Критическая	4	Несоответствие препарата установленным требованиям, которое может привести к развитию у потребителя (пациента) заболевания или тяжелым последствиям для его физического здоровья
Катастрофическая	5	Несоответствие препарата установленным требованиям, которое может привести к возникновению угрозы для жизни потребителя (пациента) с летальным исходом

Таблица 23 – Уровни вероятности возникновения риска

Вероятность (P)		
Частая	5	Один раз в месяц
Вероятная	4	Один раз в квартал
Случайная	3	Один раз в год
Незначительная	2	Один раз в два года
Невероятная	1	Один раз в три года и реже

Количественную оценку рисков проводили на основе вычисления коэффициента риска (Kr) по формуле (4) [144]:

$$Kr=S \times P \quad (4)$$

где Kr – коэффициент риска;

S – уровень опасности возникновения риска;

P – уровень вероятности возникновения риска.

Матрица последствий и вероятностей для количественного определения оцененных рисков представлена на рисунке 18.

		Качественный уровень опасности (S)				
		1	2	3	4	5
Уровень (P) вероятности	5					
	4		R_2			
	3		R_6	R_1, R_3	R_4, R_5	
	2					
	1					

Примечание:

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

Рисунок 18 – Матрица последствий и вероятностей для количественного определения оцененных рисков

К серьезному возникновению с уровнем случайной вероятности были отнесены риски R_1, R_3 . Риски R_2, R_6 оценивались с малым уровнем опасности, возможным и случайным уровнем вероятности возникновения соответственно. Диапазон рисков показывает, что в производственные процессы необходимо ввести ряд корректирующих действий.

Риски, имеющие критический уровень опасности (R_4, R_5), вошли в категорию значимых рисков и требуют проведения срочных мероприятий для снижения их экспертной оценки до приемлемого минимума.

Далее были выработаны корректирующие действия по каждому риску. Риски допустимого уровня (R_1, R_2, R_3, R_6) после проведения корректирующих

мероприятий переведены в категорию приемлемых путем проведения междуоперационных контролей.

В таблице 24 представлены идентификация, причины возникновения, последствия значимых рисков и мероприятия по их снижению, приведены корректирующие действия для рисков R₄, R₅, имеющих значимый уровень.

Таблица 24 – Идентификация, причины возникновения, последствия значимых рисков и мероприятия по их снижению

№ риска	R ₄			R ₅		
1	2			3		
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. Неквалифицированный персонал			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.

5.2 Оформление файла и отчета по менеджменту рисков

Для оценки эффективности разработанных корректирующих действий, отслеживания выявленных рисков и идентификации новых проводится мониторинг рисков. Мониторинг и контроль над рисками, так же, как и другие процессы управления рисками, являются непрерывным процессом, происходящим на протяжении всего жизненного цикла препарата. На этапе мониторинга производится пересмотр решения 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 менеджмента риска, который является ключевым элементом при завершении разработки менеджмента и составляет неотъемлемую часть документального оформления процесса управления рисками, представленного на рисунке 19.

Применяемая нами схема документирования направлена, в первую очередь, на передачу информации, создание, управление, контроль и регистрацию всех этапов управления рисками для качества и безопасности МИ.

В рамках файла соблюдена прослеживаемость для каждой идентифицированной опасности в процессе жизненного цикла разработанных препаратов. Для наборов реагентов «ДЭТ-Аг» и «ДЭТ-Иг» файл менеджмента рисков содержит шесть основных разделов:

- описание и идентификация набора;
- предусмотренное назначение и определение характеристик, относящихся к безопасности;
- идентификация опасностей и инициирующие их события (прогнозируемые, возможные);
- мероприятия по снижению рисков, верификация проведения и эффективности мероприятий;

- оценивание совокупного остаточного риска;
- производственный и постпроизводственный мониторинг рисков.

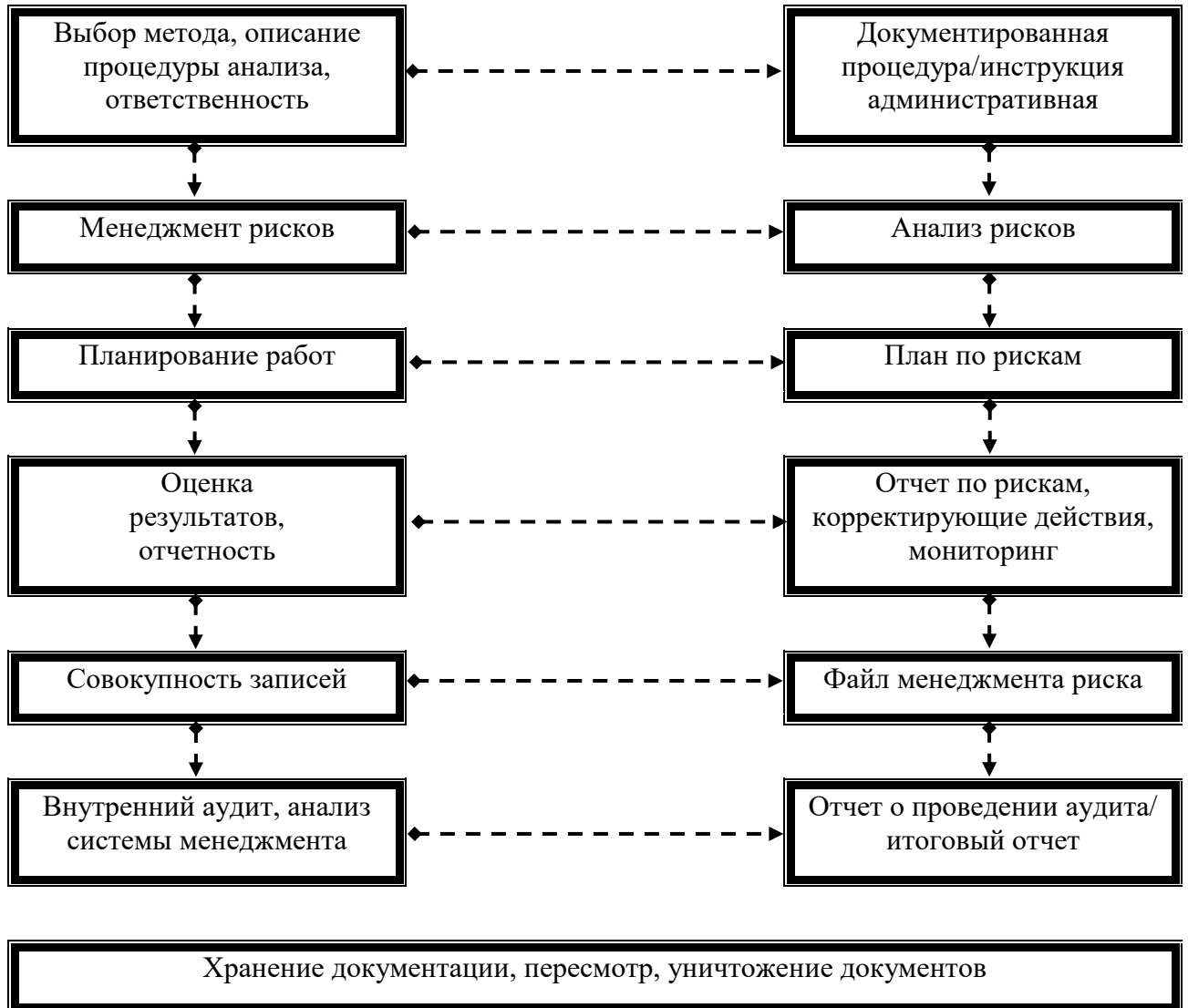


Рисунок 19 – Документальное оформление процесса управления рисками

На основании проделанной работы оформлены отчеты о проведении менеджмента рисков для наборов реагентов, которые включают следующие разделы: описание и идентификацию изделия и определение характеристик, относящихся к безопасности (область применения, показания к применению, аналитическую чувствительность, аналитическую специфичность, условия хранения и транспортировки изделия, срок годности и соблюдение мер предосторожности, прочие характеристики и условия применения).

В отчете представлена оценка, анализ опасностей и инициирующие их события (прогнозируемые, возможные), а также мероприятия по снижению риска, оценка эффективности мероприятий.

Результативность мер по снижению риска оценена качественно на основании запланированных и проведенных ранее относительно других изделий мероприятий, включенных в аналогичные производственные процессы. По некоторым мероприятиям оценка носит предположительный характер, опирается на аналогичные данные по группе изделий сходного назначения. Окончательная оценка результативности по данному конкретному препарату проводится после начала его реализации на основании производственной и постпроизводственной информации, отклика от пользователей, выявленных несоответствий в процессе производства и эксплуатации и их причин.

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 R_4 - R_5 , внесенные в категорию значимых ($Kr \geq 10$), 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 (R_1 , R_2 , R_3 , R_6) способствовали снижению их экспертной оценки до категории приемлемых ($Kr \leq 4$). Согласно критериям, установленным в «Матрице последствий и вероятностей», польза от предусмотренного применения наборов реагентов диагностических превышает остаточный риск. Информация об остаточном риске учтена при оформлении технической и эксплуатационной документации разработанного препарата.

Предложенные схемы проведения процесса менеджмента рисков могут быть использованы как типовые при проектировании и разработке диагностического набора с учетом специфики каждого отдельного производства. Отчетные документы, разработанные в рамках системы, применимы при инспекционной проверке надлежащей производственной практики и в части

комплектации регистрационных досье диагностических препаратов с последующей регистрацией в системе здравоохранения Российской Федерации.

В результате проведения исследований разработаны методические рекомендации (учрежденческий уровень): «Метод управления рисками в системе менеджмента качества», одобрены решением Ученого совета 10.12.2020, протокол № 8, утверждены директором института 10.12.2020, в которых представлены инструменты управления рисками для качества, необходимые мероприятия и документальная реализация к различным аспектам качества готовой продукции. Аспекты включают разработку, производство, реализацию, а также инспектирование и процессы представления отчетов на протяжении жизненного цикла препарата.

На основании технологических процессов, информации по рискам и принятых мер по их уменьшению или устранению лиофилизированных препаратов оформлена нормативная документация (пусковые регламенты: «Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный сухой» («ДЭТ-Аг») ПУР № 01897080-37-20; «Диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый сухой» («ДЭТ-Иг») ПУР № 01897080-38-20, технические условия: «ДЭТ-Аг» ТУ 21.20.23-055-01897080-2020; «ДЭТ-Иг» ТУ 21.20.23-056-01897080-2020, инструкции по применению, маркировка первичной и вторичной упаковки), которая одобрена решением Ученого совета 10.12.2020, протокол № 8 и утверждена директором института 10.12.2020 (Приложения 4-13). Готовые наборы представлены на рисунках 20 и 21.

Экспериментально-производственные серии диагностикумов успешно прошли лабораторные, межлабораторные, квалификационные испытания, проведенные совместно с сотрудниками ЛБТК ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, и показали своё соответствие требованиям нормативной документации, предъявляемым к данным препаратам.



Рисунок 20 – Набор реагентов Диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый сухой («ДЭТ-Иг»)



Рисунок 21 – Набор реагентов Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный сухой («ДЭТ-Аг»)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Туляремия – природно-очаговая, зоонозная инфекция, природные очаги которой широко распространены на большей части территории Российской Федерации. Возбудитель туляремии *F. tularensis* обладает высокой патогенностью для человека, что определяет место данного возбудителя в высшей категории А, среди наиболее опасных патогенных микроорганизмов потенциальных агентов биологического оружия и средств биотерроризма [72].

В связи с этим необходима ранняя лабораторная диагностика туляремии, так как своевременное выявление источника инфекции занимает основное место в системе противоэпидемических мероприятий.

Требования к разработке и производству диагностических препаратов, необходимых для выявления возбудителей инфекционных болезней, регламентированы СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» [133] и ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств» [23].

В настоящей работе представлены результаты научно-методических разработок состава эффективных сред высушивания, стабилизации путем лиофилизации наборов диагностических эритроцитарных для экспресс-индикации туляремии и детекции её возбудителя, а также апробации препаратов на клиническом и полевом материале, менеджмента рисков на всех этапах производства и контроля.

Практическое применение эритроцитарных препаратов в жидкой форме показало их существенные недостатки, связанные с транспортировкой на значительные расстояния. Несоблюдение режимов холодной цепи приводит к полной потере их биологической активности.

С целью стабилизации жидких форм эритроцитарных препаратов проведены научные исследования по подбору сред высушивания, режиму лиофилизации, т.е. по разработке биотехнологии получения лиофилизированных форм диагностикумов и 50 % формализированных эритроцитов барана, которая позволила создать оптимальные условия для предотвращения агрегации

эритроцитов и реагентов, сохранить первоначальные свойства препаратов в течение длительного времени и сконструировать лиофилизированные наборы диагностикумов.

При составлении композиций защитных сред использовали несколько разных ингредиентов: ПАВ, которые могут уменьшить денатурацию белков во время замораживания за счет уменьшения границы раздела лёд-вода [172]; углеводы, связывающиеся с поверхностью биологического материала и защищающие препарат от повреждений при высыхании [169], коллоиды, обладающие защитным действием, что, вероятно, связано со способностью формировать при замораживании-высушивании аморфную фазу с низкой молекулярной подвижностью [35], антиоксиданты, обладающие мощной биологической активностью [89], антисептики, угнетающие микробный пророст.

Нами проведен подбор и оптимизация концентраций компонентов защитных сред. Наилучшими свойствами обладала среда, состоящая из сахарозы, тиомочевины, желатина, твин 80 и азида натрия. При отработке режима лиофилизации, которую проводили на установке для сублимационной сушки Alpha 2-4, учитывали все параметры: длительность периода сублимации и десорбции – (13 ± 1) ч при плавном повышении температуры полки до $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, вакууме – $0,15\text{-}0,25$ мбар ($15\text{-}25$ Па) и температуре конденсатора минус $80\text{-}90\text{ }^{\circ}\text{C}$.

После лиофилизации физико-химические (растворимость, прозрачность, цветность, потеря в массе при высушивании) и иммунобиологические (аналитическая чувствительность, аналитическая специфичность) показатели диагностикумов и 50 % взвеси формализированных эритроцитов барана оставались на уровне исходных. Препараты имели характерную структуру высушенного материала без признаков микрооттаивания; потеря в массе при высушивании не более 3 %; растворимость не превышала 1 мин.

Для определения аналитической чувствительности и специфичности проведены лабораторные испытания диагностикума эритроцитарного туляремийного антигенного сухого на коммерческих (туляремийной, бруцеллёзной, холерной, сальмонеллёзной) и экспериментальных гипериммунных

туляреминых кроличьих сыворотках. В результате аналитическая чувствительность составила 1:20000-1:80000 (макрометод) и 1:10000–1:40000 (микрометод), специфичность подтверждена отсутствием перекрестных реакций с гетерологичными сыворотками.

При контроле диагностикума эритроцитарного туляреминого иммуноглобулинового сухого с целью определения аналитической чувствительности и специфичности использовали 16 гомологичных и 8 гетерологичных штаммов. Аналитическая чувствительность 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).

Проведенные исследования показали, что получение лиофилизированных препаратов с использованием защитной среды высушивания позволило предотвратить агрегацию эритроцитов, сохранить первоначальные свойства диагностикумов эритроцитарных туляреминых в течение срока годности, независимо от температурного режима. Среда высушивания содержит не только ингредиенты, предохраняющие препарат от разрушения при замораживании и лиофилизации, но и твин 80, позволяющий осуществлять постановку РНГА без разводящей жидкости, а также азид натрия – консервант, предотвращающий микробный пророст при длительном хранении растворенного препарата.

Было сконструировано два набора реагентов с полностью лиофилизированным составом: набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляреминый антигенный сухой» («ДЭТ-Аг»), предназначенный для анализа сыворотки крови человека на наличие специфических антител против туляреминого микроба и набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляреминый иммуноглобулиновый сухой» («ДЭТ-Иг») – для качественного определения возбудителя туляремии в бактериальных культурах, биологическом материале и объектах окружающей среды.

Компонентный состав лиофилизированных наборов реагентов «ДЭТ-Аг» и «ДЭТ-Иг» представлен на рисунке 22.

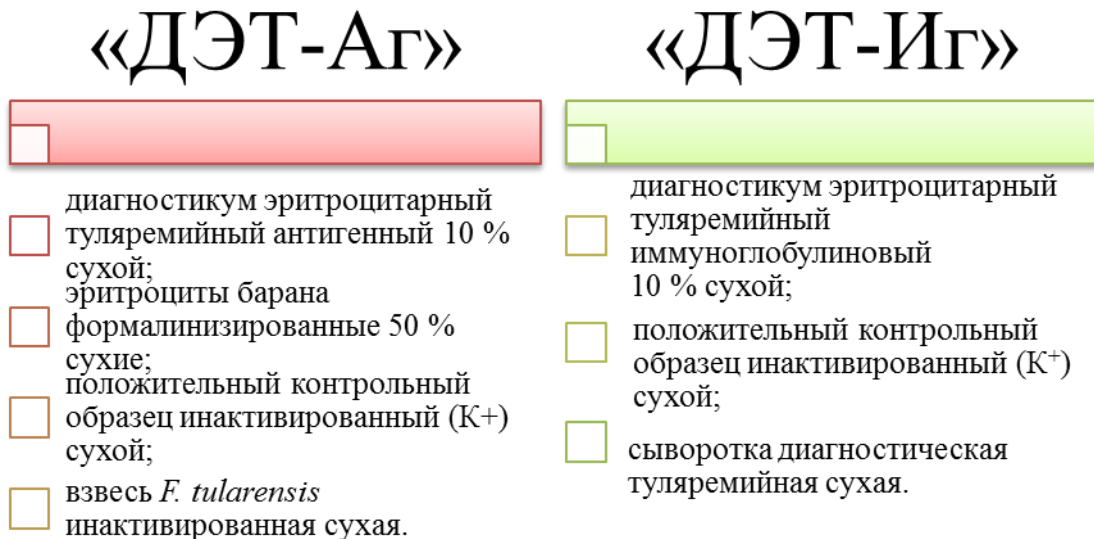


Рисунок 22 – Компонентный состав наборов реагентов «ДЭТ-Аг» и «ДЭТ-Иг»

Осуществлены исследования стабильности показателей лиофилизированных препаратов методом «ускоренного старения», долгосрочности при хранении (*shelf life*), стабильности при транспортировании и использовании. На основании данных, полученных как в долгосрочных, так и в ускоренных испытаниях, установлен срок годности наборов реагентов «ДЭТ-Аг» и «ДЭТ-Иг» в течение двух лет. Экспериментально доказано, что в течение этого периода времени качественные показатели препаратов остаются на уровне, соответствующем требованиям нормативной документации (НД). Доказана возможность транспортирования наборов реагентов в различных температурных режимах (от минус 37 °С до 37 °С) в течение 30 сут, в процессе применения восстановленный препарат характеризуется стабильностью в течение 8 сут при температуре хранения от 2 до 8 °С.

Набор реагентов «ДЭТ-Иг» успешно апробирован на полевом материале (вода, экскременты мышевидных грызунов, погадки хищных птиц, органы павших животных, помет хищных млекопитающих) из объектов окружающей среды, взятых из природных очагов туляремии (2020 г., 2022 г.) и во время вспышки туляремии в Петровском округе Ставропольского края (2022 г.). Всего было отработано 73 пробы, из них в 19 пробах обнаружен антиген возбудителя туляремии (из 21 пробы положительных), подтверждённых в ИФА-МИС и ПЦР.

В результате было установлено, что диагностическая чувствительность составила 90 %, диагностическая специфичность – 96 % (из 52 проб – 50 проб были отрицательными).

Для определения диагностической ценности набора реагентов «ДЭТ-Аг» использовали клинический материал (сыворотки крови), полученный от людей, не болевших ранее туляремией и не вакцинированных против нее; людей, вакцинированных против туляремии; людей больных туляремией. Всего было исследовано 49 сывороток, из них 27 сывороток из 29 (сыворотки людей больных и вакцинированных) положительных, что подтверждено в ИФА и РА. Из 20 сывороток людей не больных и не вакцинированных против туляремии – 18 отрицательных. В результате было установлено, что диагностическая чувствительность составила 93 %, диагностическая специфичность – 90 %.

Медицинские иммунобиологические препараты (МИБП) должны в полной мере соответствовать требованиям НД на диагностические препараты. Использование диагностических препаратов ненадлежащего качества, с нарушением условий хранения или без соблюдения требований СанПиН может нанести вред здоровью людей из-за неправильного поставленного диагноза. Поэтому очень важно учитывать не только вероятность потерь и объемы, но и остроту риска.

При планировании процессов обеспечения качества целесообразно учитывать и использовать совокупность организационных и технических мер, регламентирующих основные аспекты производства препаратов.

Для обеспечения качества набора реагентов на всех стадиях жизненного цикла, включающего производство, контроль, хранение, транспортировку, использование и утилизацию применяли менеджмент рисков, анализируя общую блок-схему технологического процесса (рисунок 23), раздел технологического контроля и принципиальную схему производства (рисунок 24), которая складывается из последовательных стадий и операций, характерных для производства наборов реагентов «ДЭТ-Аг» и «ДЭТ-Иг».

Для визуализации выделенных рисков использовали «Матрицу последствий и вероятностей». 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.

Проведена идентификация, оценка и анализ рисков, связанных с производством и применением наборов реагентов диагностикумов эритроцитарных туляремиальных лиофилизированных на протяжении всего жизненного цикла. Согласно критериям, установленным в «Матрице последствий и вероятностей», польза от предусмотренного применения наборов реагентов диагностических превышает остаточный риск. Информация об остаточном риске учтена при разработке технической и эксплуатационной документации препаратов.

В результате проведения менеджмента рисков разработан алгоритм анализа и оценки рисков при производстве и использовании наборов реагентов диагностических эритроцитарных туляремиальных. Были решены следующие задачи по менеджменту рисков:

- изучены теоретико-методические основы анализа и оценки производственных рисков;
- проведена идентификация, анализ производственных рисков наборов реагентов диагностикумов эритроцитарных. Нами было выявлено 6 рисков, из них 2 риска (R_4 , R_5), имеющие критический уровень опасности и вошедшие в категорию значимых рисков; 4 риска (R_1 , R_2 , R_3 , R_6) допустимого уровня;
- проанализированы идентифицированные риски и определены срочные мероприятия для снижения их экспертной оценки до приемлемого минимума. Остаточные риски находятся в приемлемой зоне риска;
- разработаны принципы, элементы и методы анализа и оценки производственных рисков для «ДЭТ-Аг» и «ДЭТ-Иг».

Предлагаемый алгоритм анализа и оценки задокументирован в файле рисков, в котором соблюдена прослеживаемость для каждой идентифицированной опасности в процессе жизненного цикла разработанных диагностических препаратов. По каждому риску формулируются причины и

возможные последствия, разрабатываются меры по устранению/минимизации рисков, прописываются показатели, по которым будет осуществляться мониторинг реализации мер по устранению/минимизации.



Рисунок 23 – Блок-схема производства и исследования наборов реагентов диагностикумов эритроцитарных туляреминых

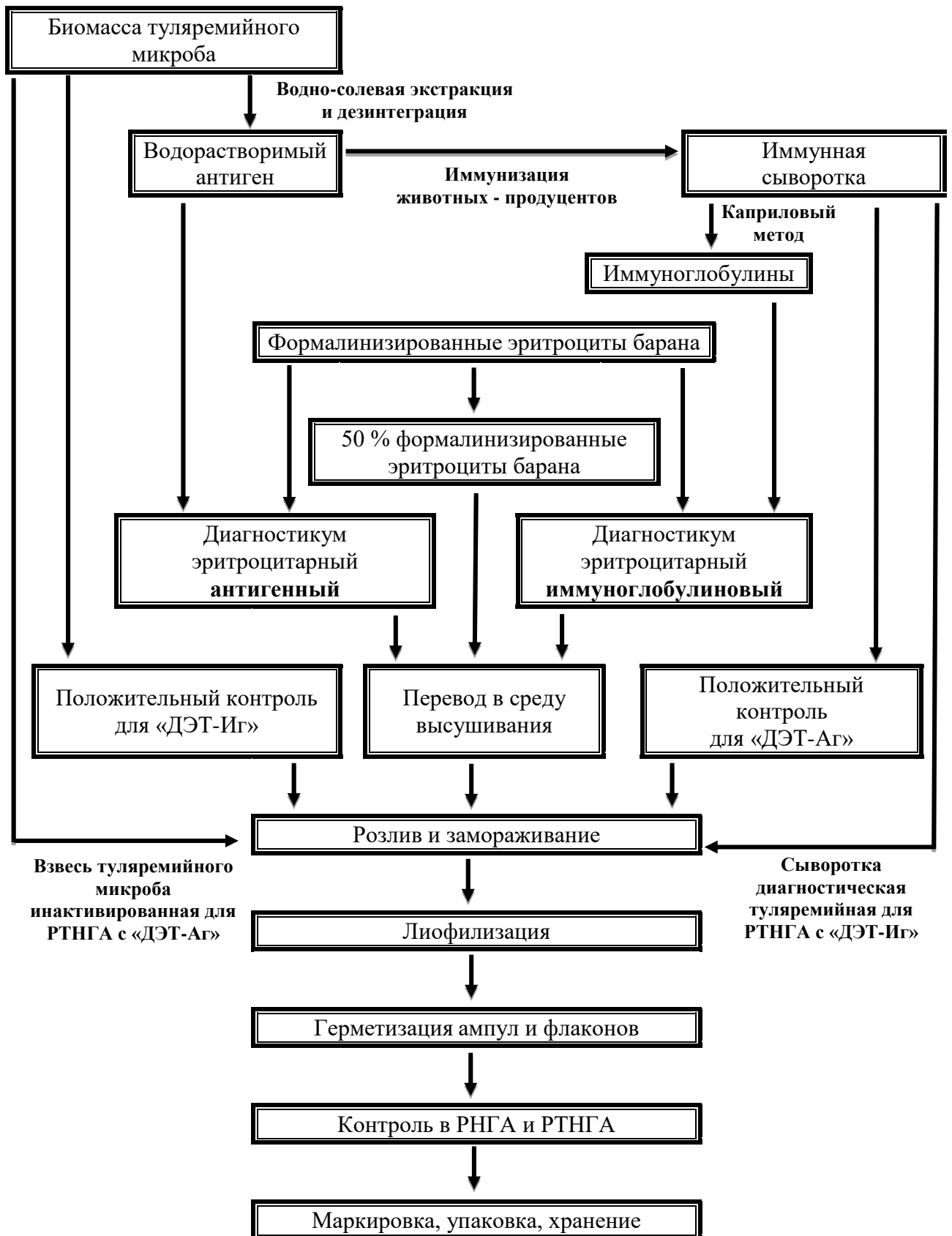


Рисунок 24 – Принципиальная схема производства наборов реагентов «ДЭТ-Аг» и «ДЭТ-Иг»

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

В итоге проведённых диссертационных исследований подтверждены основные биотехнологические подходы к разработке, изучению, производству лиофилизированных наборов реагентов диагностикумов эритроцитарных для диагностики туляремии и индикации её возбудителя, включающие: подбор сред высушивания, компоновку их состава, отработку режимов и схем лиофилизации, определение стабильности, контроль аналитической чувствительности и специфичности, диагностической ценности и проведение менеджмента рисков. В результате менеджмента рисков определены возможные причины возникновения и последовательность событий по каждому опасному фактору производственного процесса, которые учтены при производстве серий препаратов и составлении нормативной документации: на набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремиальный иммуноглобулиновый сухой» («ДЭТ-Иг») ПУР № 01897080-38-20, ТУ 21.20.23-056-01897080-2020, инструкция по применению, маркировка первичной и вторичной упаковки. НД одобрена решением Ученого совета ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора и утверждена директором института (протокол № 8 от 10.12.2020); на набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремиальный антигенный сухой» («ДЭТ-Аг») ПУР № 01897080-37-20, ТУ 21.20.23-055-01897080-2020, инструкция по применению, маркировка первичной и вторичной упаковки. НД одобрена решением Ученого совета ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора и утверждена директором института (протокол № 8 от 10.12.2020). Проведены межлабораторные испытания «ДЭТ-Иг» (протокол № 2 от 12.03.2021) и «ДЭТ-Аг» (протокол № 1 от 12.03.2021), квалификационные испытания «ДЭТ-Аг» (акт № 1 от 29.10.2021). Подготовлен пакет документов для регистрации в Федеральную службу по надзору в сфере здравоохранения (Росздравнадзор).

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 возможность получения 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 туляремиальных 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 туляремиальных 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 МИ ИВД 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 ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аладышева, Ж.И. Промышленная фармация. Путь создания продукта: монография / Ж.И. Аладышева, В.В. Беляев, В.В. Береговых [и др.]; под ред. А.Л. Хохлова, Н.В. Пятигорской. – М.: Российская академия наук, 2019. – 394 с.
2. Алексеев, К.В. Теоретические и практические основы лиофилизации лекарственных препаратов: монография / К.В. Алексеев, Е.В. Блынская, С.В. Тишков. – Москва: ООО «Типография «Миттель пресс», 2019. – 219 с.
3. Анциферова, Е.С. Сублимационное высушивание в процессе получения лекарственных препаратов / Е.С. Анциферова, К.В. Завидовская, Д.А. Алиева, Л.П. Лазурина // Горизонты биофармацевтики: материалы VII Международной научно-практической молодежной конференции, посвященной 86-летию Курского государственного медицинского университета. – Курск, 2021. – С. 22-24.
4. Арнаудова, К.Ш. Современные серологические и иммунологические тесты для диагностики вирусных заболеваний / К.Ш. Арнаудова, М.Р. Копылова, З.В. Жаркова, Г.Н. Генатуллина // Прикасп. вест. мед. и фарм. – 2022. – № 1 (3). – С. 15-19.
5. Аршинова, О.Ю. Технология и стандартизация лиофилизированных лекарственных препаратов фотодитазина: дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.01 / Аршинова Ольга Юрьевна. – Москва, 2015. – 153 с.
6. Афанасьев, Е.Н. Разработка новых подходов к получению гипериммунных сывороток для производства медицинских иммунобиологических препаратов / Е.Н. Афанасьев, И.С. Тюменцева, О.И. Коготкова [и др.] // Проб. особ. опасн. инф. – 2010. – № 1 (103). – С. 67-69.
7. Бабакина, М.В. Определение состава протективной среды и режима высушивания для стабилизации консорциума дрожжей *ZYGOSACCHAROMYCES KOMBUCHAENSIS* и бактерий *GLUCONACETOBACTER XYLINUS* / М.В. Бабакина, Т.В. Першакова, М.В. Самойленко // Плодов. и виногр. юга России. – 2022. – № 1 (73). – С. 233-242.

8. Белоус, А.М. Криоконсерванты / А.М. Белоус, М.И. Шраго, Н.С. Пушкарь. – Киев: Наукова думка, 1979. – 198 с.

9. Береговых, В.В. Применение подхода, основанного на рисках, для определения критических факторов при переносе технологии в производстве лекарственных средств / В.В. Береговых, О.Р. Спицкий // Вест. рос. акад. мед. наук. – 2014. – № 9-10. – С. 117-122.

10. Берковский, А.Л. Получение лиофилизированной плазмы с сохраненной активностью факторов свертывания / А.Л. Берковский, Е.В. Сергеева, А.В. Суворов [и др.] // Гемат. и трансф. – 2016. – № 4 (61). – С. 204-208.

11. Блынская, Е.В. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации пептидов и белков / Е. В. Блынская, С.В. Тишков, К.В. Алексеев, А.И. Марахова // Фарм. – 2017. – № 1 (66). – С. 14-18.

12. Блынская, Е.В. Математическое моделирование этапа замораживания в технологии лиофилизированных лекарственных форм / Е.В. Блынская, С.В. Тишков, К.В. Алексеев, С.В. Минаев // Рос. биотерап. жур. – 2018. – №. 2 (17). – С. 15-21.

13. Борзов, В.И. Применение менеджмента риска для реализации риск-ориентированного мышления в системе менеджмента качества / В.И. Борзов // Извес. Тульского гос. унив. Тех. науки. – 2022. – № 8. – С. 7-10.

14. Бурова, Е.Д. Управление рисками для обеспечения качества доклинических исследований лекарственных средств / Е.Д. Бурова, С.В. Ходько, С.В. Гущина [и др.] // Вед. Науч. центра экспер. средств мед. применения. – 2017. – № 1. – С. 25-31.

15. Власов, В.А. Оценки, решения, риски / В.А. Власов. – М.: Бином пресс, 2012. – 256 с.

16. Волков, В.Я. К вопросу о физиологических и физико-химических механизмах устойчивости микроорганизмов к замораживанию и высушиванию / В.Я. Волков // Микробиол. – 1994. – №. 63 (1). – С. 5-15.

17. Галеева, Ж.В. Управление рисками на фармацевтическом производстве / Ж.В. Галеева // Инновации в здоровье нации: сборник материалов VII

Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 2019. – СПб-П: ФГБОУ ВС «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» МЗ РФ, 2019. – С. 137-140.

18. Гаркуша, Ю.Ю. Разработка стандартных условий производства магноиммуносорбентов / Ю.Ю. Гаркуша, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций на Северном Кавказе: материалы региональной научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 70-летию со дня основания ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. – Ставрополь, 2022. – С. 195-196.

19. Гирш, Т.А. Анализ рисков при производстве лекарственных средств. Методы оценки соответствия / Т.А. Гирш // Мет. оц. соотв. – 2013. – № 5. – С. 22-24.

20. Гончаров, Д.С. Комплексный подход к управлению рисками для российских компаний / Д.С. Гончаров. – М.: Вершина, 2008. – 224 с.

21. ГОСТ Р 51901.1-2002 Управление надежностью. Анализ риска технологических систем. – М.: Госстандарт России, 2002. – 28 с.

22. ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний. – М.: Стандартиформ, 2014. – 23 с.

23. ГОСТ Р 52249-2009 Правила производства и контроля качества лекарственных средств. – М.: Стандартиформ, 2010. – 138 с.

24. ГОСТ Р 53022.2-2008 Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования (точность, чувствительность, специфичность). – М.: Стандартиформ, 2009. – 28 с.

25. ГОСТ Р 53022.3-2008 Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. – М.: Стандартиформ, 2009. – 18 с.

26. ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*. – М.: Стандартинформ, 2015. – 8 с.

27. ГОСТ Р ИСО 31000-2019 Менеджмент риска. Принципы и руководство. – М.: Стандартинформ, 2020. – 14 с.

28. ГОСТ Р ИСО 9001-2015 Системы менеджмента качества. – М.: Стандартинформ, 2015. – 32 с.

29. ГОСТ ISO 14971-2021 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям: описание стандарта и тендеры. – М.: Российский институт стандартизации, 2021. – 24 с.

30. Горбатов, А.А. Сравнительное исследование экспериментальных и коммерческих серологических тестов для определения противотуляреминых антител у людей / А.А. Горбатов, П.В. Соловьёв, Е.В. Баранова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – № 10. – С. 630-635.

31. Гордина, А.В. Алгоритм выбора оптимального способа получения бактериальных антигенов / А.В. Гордина, Н.В. Богачева // Актуальные проблемы и достижения в естественных и математических науках: сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции. – Самара, 2017. – С. 33-35.

32. Горобец, Е. А. Совершенствование способа получения иммунных кроличьих сибиреязвенных капсульно-соматических сывороток / Е.А. Горобец, Е.Н. Афанасьев, И.С. Тюменцева [и др.] // Мед. вестник Северного Кавказа. – 2008. – № 1. – С. 42-44.

33. Горюнова, Л.А. Инновационная система. Инструменты и механизмы управления): монография / Л.А. Горюнова. – Санкт-Петербург: изд-во Санкт-Петербургского гос. ун-та экономики и финансов, 2011. - 202 с.

34. Горюнова, Л. Менеджмент риска / Л. Горюнова // Ремедиум. – 2011. – № 7. – С. 16-23.

35. Грачева, И.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред / И.В. Грачева, А.В. Осин // Пробл. особ. опасн. инф. – 2016. – № 3 (5). – С. 5-12.

36. Гусаров, Д.А. Лиофилизация биофармацевтических белков (миниобзор) / Д.А. Гусаров // Биофарм. журнал. – 2010. – №. 5 (2). – С. 3-7.

37. Гусева, И.Б. Исследование подходов к оценке рисков НИОКР / И.Б. Гусева, О.В. Кудряшова // Наука в центральной России. – 2013. – № 4. – С. 94-96.

38. Давыдова, Г.В. Методика количественной оценки риска банкротства предприятий / Г.В. Давыдова, А.Ю. Беликов // Управление риском. – 1999. – № 3 (23). – С. 13-20.

39. Дилай, Н.В. Управление рисками для качества по содержанию бактериальных эндотоксинов при производстве лекарственных средств для парентерального применения / Н.В. Дилай, Т.Г. Калынюк // Вестник фарм. – 2015. – № 3 (69). – С. 11-16.

40. Долгов, В.В. Иммунохимический анализ в лабораторной медицине: учебное пособие / В.В. Долгов. - Москва: Триада, 2015. – 421 с.

41. Дмитриева, М.В. Выбор криопротектора для получения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола ЛХС-1269 / М.В. Дмитриева, Бу Лугэнь, А.П. Полозкова [и др.] // Рос. биотерап. журнал. – 2021. – № 1 (20). – С. 74-79.

42. Дубровина, В.И. Особенности влияния липополисахарида туляремийного микроба разных подвидов на метаболическую активность фагоцитов *in vitro* / В.И. Дубровина, Ж.А. Коновалова, В.Б. Николаев [и др.] // Пробл. особ. опасн. инф. – 2011. – № 2 (108). – С. 57-60.

43. Евченко, А.Ю. Биотехнологические разработки латексных препаратов для диагностики инфекционных болезней / А.Ю. Евченко, И.В. Жарникова, Т.В. Жарникова [и др.] // Вестник биотех. и физ.-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2022. – № 1 (18). – С. 60-70.

44. Еделев, Д.А. Анализ опасных факторов – ключевой элемент системы НАССР / Д.А. Еделев, В.А. Матисон, М.А. Прокопова [и др.] // Пищ. промыш. – 2015. – № 2. – С. 26-29.

45. Еремин, С.А. Разработка новых технологических схем и масштабирование процессов получения антигенов чумного и туляреминого микробов / С.А. Еремин, О.А. Волох, И.А. Шепелев [и др.] // Пробл. особ. опасн. инф. – 2006. – № 2 (92). – С. 58-61.

46. Еремкин, А.В. Разработка иммуноферментной и иммунохроматографической моноклональных тест-систем для выявления возбудителя туляремии / А.В. Еремкин, Г.Д. Елагин, Д.В. Печенкин [и др.] // Клин. Лаб. Диагн.. – 2016. – № 3 (61). – С. 184-187.

47. Ермасова, Н.Б. Риск-менеджмент организации / Н.Б. Ермасова. – М.: Издательство «Альфа-Пресс», 2005. – 240 с.

48. Жарникова, И.В. Методологические подходы и разработка биотехнологии иммунобиологических препаратов для диагностики инфекционных особо опасных заболеваний и детекции их возбудителей: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.23 / Жарникова Ирина Викторовна. – Ставрополь, 2004. – 313 с.

49. Жарникова, И.В. Серологические методы выявления возбудителя туляремии и их оценка / И.В. Жарникова, В.И. Ефременко, Т.В. Жарникова [и др.] // ЖМЭИ. – 2019. – № 4. – С. 32-38.

50. Жарникова, И.В. Сравнительная характеристика биотехнологии получения эритроцитарных и латексных диагностикумов для выявления возбудителя туляремии / И.В. Жарникова, Е.В. Жданова, Т.В. Жарникова [и др.] // Вест. биотех. и физ.-хим. биол. им. Ю.А. Овчинникова. – 2019. – № 4 (15). – С. 27-31.

51. Жарникова, Т.В. Совершенствование биотехнологических процессов получения диагностических препаратов для выявления возбудителя туляремии с использованием иммобилизованных носителей / Т.В. Жарникова, И.В. Жарникова, Ю.М. Евченко // Бактер. – 2018. – № 1 (3). – С. 55-58.

52. Жоров, О.В. Полиакролеиновый латекс в качестве твердофазного носителя для иммунорадиометрического анализа. Сравнение с микрокристаллической целлюлозой и поверхностью полистирольных пробирок / О.В. Жоров, В.А. Прейгерзон, Ю.В. Лукин [и др.] // Биоорг. хим. – 1995. – № 4 (21). – С. 261-267.

53. Кальной, С.М. Получение и использование магнитных латексов в методах иммуноанализа антигенов микроорганизмов / С.М. Кальной, И.В. Жарникова, А.А. Зайцев [и др.] // Прикл. биох. и микроб. – 2010. – № 4 (46). – С. 491-500.

54. Кальной, С.М. Физико-химические и иммунобиологические параметры магносорбентов для конструирования диагностических препаратов / С.М. Кальной, С.А. Куникин, А.Ю. Газиева // Символ науки. – 2016. – № 2. – С. 33-35.

55. Клейнер, Г.Б. Стратегия предприятия / Г.Б. Клейнер. – М.: Дело, 2008. – 567 с.

56. Коваленко, А.В. Управление рисками фармацевтического предприятия: дис. ... канд. эконом. наук: 08.00.05 / Коваленко Александр Владимирович. – М., 2009. – 173 с.

57. Комиссаров, А.В. Исследование процесса сублимационного высушивания иммуногенов холерной химической вакцины / А.В. Комиссаров, Н.Н. Кочкалова, Н.В. Сеницына [и др.] // Пробл. особ. опасн. инф. – 2016. – №. 1. – С. 90-93.

58. Комиссарова, В.А. Новые подходы к обеспечению качества на фармацевтическом производстве / В.А. Комиссарова // Мед. этика. – 2019. – № 1 (7). – С. 102-106.

59. Корнеева, В.М. Современные методы управления рисками на предприятиях / В.М. Корнеева, С.В. Пупенцова // Пробл. соц-эконом. разв. Сибири. – 2020. – № 2. – С. 33-38.

60. Коршунова, Л.Н. Оценка и анализ рисков / Л.Н. Коршунова, Н.А. Проданова. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2007. – 96 с.

61. Костяев, А.А. Токсичность криопротекторов и криоконсервантов на их основе для компонентов крови и костного мозга (обзорная статья) / А.А. Костяев, А.К. Мартусевич, А.А. Андреев // Науч. обзор. Мед. науки. – 2016. – № 6. – С. 54-74.

62. Кочкалова, Н.Н. Определение эвтектической температуры методом электропроводности и исследование тепловых параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии / Н.Н. Кочкалова, А.К. Никифоров, Н.Г. Манин, Е.Г. Абрамова // Биотех. – 2011. – № 5. – С. 80-84.

63. Кудрявцева, Т.Ю. Генетическое разнообразие семейства *Francisellaceae*, анализ ситуации по заболеваемости туляремией на территории Российской Федерации в 2021 г / Т.Ю. Кудрявцева, В.П. Попов, А.Н. Мокриевич, Е.С. Куликалова, А.В. Холин, А.В. Мазепа, Д.В. Транквилевский., М.В. Храмов, И.А. Дятлов // Пробл. особ. опасн. инф. – 2022. – № 1. – С. 6-14.

64. Кудрявцева, Т.Ю. Туляремия в мире / Т.Ю. Кудрявцева, А.Н. Мокриевич // Инф. и иммун. – 2021. – № 2. – С. 249-264.

65. Кулешова, Е.В. Управление рисками проектов: учебное пособие / Е.В. Кулешова. – Томск: Эль Контент, 2015. – 188 с.

66. Кузнецова, Е.М. Оптимизация способов получения антигенных комплексов туляремийного микроба и конструирование на их основе диагностических препаратов: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Кузнецова Екатерина Михайловна. – Саратов, 2012. – 150 с.

67. 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 [и др.] // БИОпр. Проф., диагн., леч. – 2022. – №. 2 (22). – С. 196-207.

68. Лапуста, М.Г. Малое предпринимательство / М.Г. Лапуста, Ю.Л. Старостин. – М.: Инфра, 2010. – 150 с.

69. Леви, М.И. Применение реакции пассивной гемагглютинации для обнаружения антител к ДНК / М.И. Леви, А.М. Поверенный // Журн. гиг., эпидемиол., микробиол. и иммунол. (Прага). – 1965. – № 9. – С.418.

70. Лимарева, Т.Д. Влияние условий сублимационного высушивания пробиотиков на специфическую активность / Т.Д. Лимарева, Н.В. Девякович, М.И. Демешева [и др.] // Сибир. мед. журн. – 2009. – № 2-2 (54). – С. 68-70.

71. Литвинов, О.Б. Проточная цитометрия: инновации нашего времени / О.Б. Литвинов, В.Е. Брылина, Е.С. Сизова [и др.] // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии, биотехнологии и экспертизы сырья и продуктов животного происхождения: сборник трудов научно-практической конференции. - 2022. - С. 338-339.

72. Мещерякова, И.С. Туляремия: современная эпидемиология и Вакцинопрофилактика (к 80-летию создания первой туляремийной лаборатории в России) / И.С. Мещерякова // Эпид. и вакцинопроф. – 2020. – № 2. – С. 17-22.

73. Микаилов, М.М. Диагностическая ценность отечественных и зарубежных серологических тестов для диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота / М.М. Микаилов, Ш.А. Гунашев, Э.А. Яникова [и др.] // Труд. Куб. гос. аграр. унив. - 2022. - № 101. - С. 268-271.

74. Музалевский, А.А. Управление риском: учебное пособие / А.А. Музалевский. – СПб.: РГГМУ, 2020. – 56 с.

75. МУ 3.1.2007-05 Эпидемиологический надзор за туляремией. Методические указания. – М., 2005. – 42 с.

76. МУК 4.2.2939-11. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней – М., 2012. – 61 с.

77. Назо Ф. Основы сублимационной сушки / Ф. Назо // ВОС Edwards Pharmaceutical Systems: материалы конференции с международным участием. – Москва, 2005. – С. 2-47.

78. Нежута, А.А. Разработка научно-обоснованных режимов сублимационной сушки биопрепаратов / А.А. Нежута // Биотех. – 2001. – №6. – С. 59-67.

79. Никифоров, К.А. Современные молекулярно-генетические методы и перспективы их применения для индикации и идентификации штаммов *Yersinia pestis* / К.А. Никифоров // Пробл. особ. опасн. инф. – 2022. – № 4. – С. 29-40.

80. Николаев, В.Б. Физико-химические и иммунобиологические свойства антигенов туляремийного микроба: дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Николаев Валерий Борисович. – Иркутск, 2005. – 169 с.

81. Николаева, Л.Л. Лиофилизация как способ стабилизации лекарственных препаратов (обзор) / Л.Л. Николаева, И.Д. Гулякин, О.Л. Орлова [и др.] // Хим-фарм. журн. – 2017. – № 4 (51). – С. 54-59.

82. Об утверждении требований к внедрению, поддержанию и оценке системы управления качеством медицинских изделий в зависимости от потенциального риска их применения: постановление Правительства РФ от 09.02.2022 № 136 // Собрание законодательства РФ. – 2022. – № 7. – Ст. 992.

83. Об основах охраны здоровья граждан в РФ: федеральный закон от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ // Собрание законодательства РФ. – 2011. – Ст. 157.

84. Остерман, Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1983. – 296 с.

85. ОФС 1.1.0009.18. Сроки годности лекарственных средств. Государственная фармакопея Российской Федерации. – Вед. 31.10.2018 г. – М, Стандартиформ, 2015. – 8 с.

86. ОФС.1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. – Вед. 31.10.2018 г. – М, Стандартиформ, 2015. – 2 с.

87. ОФС.1.2.3.0012.15 Определение белка. Государственная фармакопея Российской Федерации. – Вед. 31.10.2018 г. – М, Стандартиформ, 2015. – 9 с.

88. ОФС.1.4.1.0031.18 Лиофилизаты. Государственная фармакопея Российской Федерации. – Вед. 31.10.2018 г. – М, Стандартинформ, 2015. – 6 с.

89. Охалкина, В.Ю. Методы поддержания микробных культур. Часть 2. Лиофилизация / В.Ю. Охалкина // Теор. и прикл. экол. – 2009. – № 4. – С. 21-32.

90. О Стратегии развития здравоохранения в Российской Федерации на период до 2025 года: указ Президента РФ от 6.06.2019 № 254 // Правовые акты Президента РФ. – 2019. – Ст. 19.

91. Панягина, А.Е. Обзор современных методов количественной оценки рисков / А.Е. Панягина // Экон. и менедж. иннов. техн. – 2014. – № 3. – С. 94-96.

92. Пат. 1207006 СССР, МПК А61К 47/30. Защитная среда для лиофилизации эритроцитарных диагностикумов [Текст] / Волков Е.А., Рыбкин В.С., Локтионов А.М. [и др.] ; патентообладатель Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. – № 3358526/13; заявл. 18.09.1981; опубл. 10.05.1999. – 1 с.; ил.

93. Пат. 1402889 СССР, МПК G01N 25/04. 42. Способ определения температуры замерзания растворов [Текст] / Карпенко А.А., Тюрин А.Н. ; патентообладатель Институт биологии моря Дальневосточного научного центра АН СССР. – № 4089325; заявл. 26.06.1986; опубл. 15.06.1988. – 2 с.; ил.

94. Пат. 2599639 1425910 СССР, МКИ А61 К 39/02. Способ получения туляремийного антигена [Текст] / Василенко Н.Ф., Кронгауз И.В., Лопаткин О.Н. [и др.] ; патентообладатель ФГУН СтавНИПЧИ. – № 4091769; заявл. 09.07.1986; опубл. 22.05.1988. – 4 с. ; ил.

95. Пат.1692580 СССР, МПК А61К 39/02. Способ получения туляремийного антигена [Текст] / Шишкина Л.П., Марков Е.Ю., Меринова Л.В., Суханов Н.А. ; патентообладатель Федеральное государственное учреждение здравоохранения Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. – № 4676656; заявл. 11.04.1989; опубл. 23.11.1991, Бюл. № 43. – 3 с. ; ил.

96. Пат. 2010577 Российская Федерация, МПК А61К 39/40. Способ получения диагностической сыворотки [Текст] / Тюменцев С.Н., Андреевская

Н.М., Тюменцева И.С. [и др.] ; патентообладатель Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. – № 5023123/13; заявл. 09.07.1991; опубл. 15.04.1994. – 4 с. ; ил.

97. Пат. 2012126125 Российская Федерация, МПК А61К 9/19. Способы, композиции и наборы для лиофилизации [Текст] / ГО Цзяньсинь, КЛОС Энтони, БАРНЕТТ Дебора ; патентообладатель ГРИФОЛЬС ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. – № 2012126125/15; заявл. 23.11.2010; опубл. 27.12.2013, Бюл. № 36. – 2 с. ; ил.

98. Пат. 2228764 Российская Федерация, МПК А 61 К 39/44, G 01 N 33/543, 33/551. Способ получения суспензионного диагностикума (варианты) [Текст] / Жарникова И.В., Афанасьев Е.Н., Тюменцева И.С. ; патентообладатель Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. – № 2002119466/13; заявл. 18.07.2002; опубл. 27.03.2004. – 5 с. ; ил.

99. Пат. 2240822 Российская Федерация, МПК А 61 К 39/395, 39/40, 39/02. Способ получения противотуляремийной гипериммунной сыворотки и способ получения диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового сухого [Текст] / Левчук Б.А., Пятков В.А., Пекшев А.В., Кузнецов С.Л. ; патентообладатель Научно-исследовательский институт микробиологии Министерства обороны Российской Федерации. – № 2002119313/13; заявл. 17.07.2002; опубл. 27.11.2004. – 17 с. ; ил.

100. Пат. 2261623 Российская Федерация, МПК А23L 1/03, А61К 35/56. Способ лиофильной сушки биопрепарата [Текст] / Абрамова Л.С., Новикова М.В., Беседина Т.В. [и др.] ; патентообладатель ФГУП Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО) – № 2004114899/15; заявл. 18.05.2004; опубл. 10.10.2005, Бюл. 28. – 5 с. ; ил.

101. Пат. 2377308 Российская Федерация, МПК С12Р 21/08, G01N 33/554. Диагностикум псевдотуберкулезный эритроцитарный моноклональный [Текст] / Бывалов А.А., Елагин Г.Д., Печёнкин Д.В. ; патентообладатель Федеральное государственное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации». – № 2008120443/13; заявл. 22.05.2008; опубл. 27.12.2009, Бюл. № 36. – 11 с. ; ил.

102. Пат. 2476791 Российская Федерация, МПК F26B 5/06. Способ лиофильной сушки эритроцитарного диагностикума [Текст] / Пушкарь В.Г., Новицкая И.В., Кулаков М.Я. [и др.] ; патентообладатель Федеральное государственное учреждение здравоохранения Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2011127595/06; заявл. 05.07.2011; опубл. 27.02.2013, Бюл. № 6. – 9 с. ; ил.

103. Пат. 2528069 Российская Федерация, МПК C12N 1/20, A61K 39/00. Среда высушивания жидкая для стабилизации биомассы вторичного сбора чумного микроба вакцинного штамма EV [Текст] / Будыка Д.А., Катунина Л.С., Куличенко А.А. [и др.] ; патентообладатель Федеральное казённое учреждение здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2013110939/10; заявл. 12.03.2013; опубл. 10.09.2014, Бюл. № 25. – 7 с. ; ил.

104. Пат. 2540902 Российская Федерация, МПК G01N 33/531, A61K 39/104. Способ получения антигенного эритроцитарного диагностикума для обнаружения антител к антигенам возбудителей сапа и мелиоидоза [Текст] / Куделина А.М., Новицкая И.В., Кулаков М.Я. [и др.] ; патентообладатель Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2013135369/15; заявл. 26.07.2013; опубл. 10.02.2015, Бюл. № 4. – 9 с. ; ил.

105. Пат. 2549971 Российская Федерация, МПК G01N 33/531. Способ консервации иммунопероксидазного конъюгата [Текст] / Зайцев А.А., Гнусарева О.А., Курчева С.А. [и др.] ; патентообладатель Федеральное казённое учреждение здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2014126682/15; заявл. 01.07.2014; опубл. 10.05.2015, Бюл. № 13. – 11 с. ; ил.

106. Пат. 2571157 Российская Федерация, МПК C12N 1/20, A61K 35/74, C12R 1/19. Защитная среда высушивания для получения симбиотического препарата [Текст] / Самуйленко А.Я., Албулов А.И., Павленко И.В. [и др.] ; патентообладатель Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук. – № 2014109049/10; заявл. 11.03.2014; опубл. 20.12.2015, Бюл. № 35. – 8 с. ; ил.

107. Пат. 2658434 Российская Федерация, МПК C12N 5/12, G01N 33/577. Способ получения диагностикума эритроцитарного сапного иммуноглобулинового моноклонального [Текст] / Савина Е.В., Новицкая И.В., Храпова Н.П. [и др.] ; патентообладатель Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2017110450; заявл. 28.03.2017; опубл. 21.06.2018, Бюл. № 18. – 18 с. ; ил.

108. Пат. 2703282 Российская Федерация, МПК A61K 39/106. Способ получения диагностикума для определения токсина холерного вибриона, выделенного из объектов окружающей среды [Текст] / Писанов Р.В., Наркевич А.Н., Ларионова Л.В., Симакова Д.И. ; патентообладатель 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. – № 2019100730; заявл. 10.01.2019; опубл. 16.10.2019, Бюл. № 29. – 15 с. ; ил.

109. Пат. 2704829 Российская Федерация, МПК A61K 35/618. Способ производства биопрепаратов в сухой форме из гидролизатов гидробионтов [Текст] / Голубь Н.А., Рябушко В.И., Бочарова Е.А., Баландина Ю.В. ; патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» (ФИЦ ИнБЮМ). – № 2018142207; заявл. 29.11.2018; опубл. 31.10.2019, Бюл. 28. – 5 с. ; ил.

110. Пат. 2708636 Российская Федерация, МПК G01N 33/531. Универсальная среда высушивания для стабилизации эритроцитарных диагностикумов туляремиальных [Текст] / Жарникова И.В., Курчева С.А., Жданова Е.В. [и др.] ; патентообладатель Федеральное казённое учреждение здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2019124600; заявл. 30.07.2019; опубл. 10.12.2019, Бюл. № 34. – 7 с. ; ил.

111. Пат. 2709657 Российская Федерация, МПК C12N 1/20, A61K 39/10, C12N 15/31. Способ лиофильного высушивания аттенуированных бактерий *B. pertussis*, аттенуированная бактерия *B. pertussis*, штамм аттенуированных бактерий *B. pertussis*, вакцина, лиофилизированный вакцинный препарат [Текст] / Каратаев Г.И., Синяшина Л.Н., Семин Е.Г. [и др.] ; патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). – № 2017128106; заявл. 07.08.2017; опубл. 19.12.2019, Бюл. № 35. – 17 с. ; ил.

112. Пат. 2738396 Российская Федерация, МПК C12N 1/04. Способ получения сухих бактериальных препаратов [Текст] / Миронин А.В., Туманов А.С., Тетерин В.В., Янов Д.С., Филиппов А.В. ; патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. – № 2020101876; заявл. 16.01.2020; опубл. 11.12.2020, Бюл. № 35. – 8 с. ; ил.

113. Пат. 2743227 Российская Федерация, МПК A61K 38/18, A61P 19/00. Способ получения комплекса аллогенных лиофилизированных тромбоцитарных факторов роста для стимуляции регенеративного остеогенеза [Текст] / Самодай В.Г., Стариков О.А., Калашников П.И., Мандрощенко П.А. ; патентообладатель Стариков Андрей Олегович. – № 2020113785; заявл. 03.04.2020; опубл. 16.02.2021, Бюл. № 5. – 12 с. ; ил.

114. Пат. 2746022 Российская Федерация, МПК C12N1/04, C12N1/20, A61K39/02. Способ стабилизации бактериальных клеток чумного микроба перед сублимационным высушиванием [Текст] / Дуняшева Т.Ю., Бирюков В.В., Колесников И.А., Бакулина И.Ю. ; патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. – № 2020114020; заявл. 03.04.2020; опубл. 06.04.2021, Бюл. № 10. – 8 с. ; ил.

115. Пат. 2746141 Российская Федерация, МПК C12N 1/00. Способ получения вакцины против бруцеллеза для иммунизации позвоночных животных (варианты) [Текст] / Крюкова Е.Н., Ельников В.В., Складов О.Д. [и др.] ; патентообладатель Федеральное казенное предприятие «Щелковский биокомбинат». – № 2020117577; заявл. 28.05.2020; опубл. 07.04.2021, Бюл. № 10. – 12 с. ; ил.

116. Пат. 2747420 Российская Федерация, МПК G01N33/531. Способ приготовления эритроцитарного диагностикума иммуноглобулинового туляремийного [Текст] / Жарникова И.В., Кошкидько А.Г., Курчева С.А. [и др.] ; патентообладатель Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2020124885; заявл. 17.07.2020; опубл. 04.05.2021, Бюл. № 13. – 10 с. ; ил.

117. Пат. 2749355 Российская Федерация, МПК G01N 33/531. Способ лиофилизации эритроцитарных диагностикумов туляремийных [Текст] / Кошкидько А.Г., Жарникова И.В., Курчева С.А. [и др.] ; патентообладатель Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2020124880; заявл. 17.07.2020; опубл. 09.06.2021, Бюл. № 16. – 9 с. ; ил.

118. Пат. 2772613 Российская Федерация, МПК A61K 9/19, 31/4965. Способ получения лиофилизованного препарата [Текст] / Оно Макото, Хирота

Такафуми, Мидзогаки Иори ; патентообладатель: Фуджифилм Тояма Кемикал КО., ЛТД. – № 2020124783; заявл. 14.12.2018; опубл. 23.05.2022, Бюл. № 15. – 24 с. ; ил.

119. Пат. 2777803 Российская Федерация, МПК А61К39/02, С12Q1/68. Способ получения латексных антигенных диагностикумов для выявления антител против возбудителей бруцеллеза, туляремии [Текст] / Евченко А.Ю., Жарникова И.В., Курчева С.А. [и др.] ; патентообладатель Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2021131753; заявл. 28.10.2021; опубл. 10.08.2022, Бюл. № 22. – 9 с. ; ил.

120. Полозова, Е.А. Современные аспекты управления рисками при проведении клинических исследований / Е.А. Полозова // Кач. клин. практ. – 2020. – № 1. – С. 45-52.

121. Попова, А.Ю. Эпидемиология и профилактика туляремии на эндемичных территориях России / А.Ю. Попова, В.В. Мефодьев, Т.Ф. Степанова [и др.]. – Тюмень: Изд. Центр ТГУ, 2016. – 332 с.

122. Потт, А.Б. Использование полиоксидония для получения иммунных сывороток с высоким титром нейтрализующих анти-хантавирусных антител / А.Б. Потт // Студенческий научный форум: матер. VI Международной студенческой научной конф. – Пенза, 2014. – 41 с.

123. Похиленко, В.Д. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В.Д. Похиленко, А.М. Баранов, К.В. Детушев // Извест. выс. уч. зав. Поволжский регион. Мед. наук. – 2009. – № 4 (12). – С. 99-121.

124. Примаков, Е.В. Применение метода FMEA при анализе экологических рисков фармацевтического предприятия / Е.В. Примаков, Н.Г. Николаева // Мет. менедж. кач. – 2011. – № 11. – С. 22-30.

125. Пушкарь, В.Г. Усовершенствование процесса лиофильного высушивания иммунобиологических препаратов на современном оборудовании /

В.Г. Пушкарь, И.В. Новицкая, М.Я. Кулаков [и др.] // Вестник ВолГМУ. – 2011. – № 4 (40). – С. 65-67.

126. Разработка оптимального состава защитной среды для лиофилизации бактериофагов рода *Bacillus* [Электронный ресурс]. – Форум 2017. Биологические науки. – 2017. Режим доступа: <https://scienceforum.ru/2017/article/2017036593>.

127. Рекомендаций по организации производства и контроля качества лекарственных средств [Электронный ресурс]: Росздравнадзор письмо от 15 июля 2009 года № 01И-396/09 . – Документ опубликован не был. - Доступ из справ. правовой системы «КонсультантПлюс».

128. Родионова, М.А. Анализ рисков на предприятии / М.А. Родионова, Л.А. Редько // *Gaudeamus igitur*. – 2015. – № 4. – С. 40-43.

129. Родионова, М.А. Анализ рисков процесса экспертным методом / М.А. Родионова // *Качество - стратегия XXI века: сборник научных трудов XIX Всероссийской научно-практической конференции, Томск, 9-12 Декабря 2014.* – Томск: ТПУ, 2015. – С. 183-187.

130. Родионова М.А. Проектирование и внедрение процесса менеджмента риска в системе качества предприятия: магистр. дис.: 27.04.02 / Родионова Мария Александровна. – Томск, 2016. – 212 с.

131. Рубис, Л.В. Использование реакции непрямой гемагглютинации для диагностики туляремии / Л.В. Рубис // XII съезд Всероссийского Научно-Практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов: статья в сборнике трудов конференции. - 2022. - С. 472-473.

132. Руководство по установлению допустимых пределов воздействия на здоровье в целях идентификации рисков при производстве лекарственных средств на общих производственных (технологических) линиях [Электронный ресурс]: решение Коллегии ЕЭК от 14.01.2020 № 1. – Документ опубликован не был. - Доступ из справ. правовой системы «КонсультантПлюс».

133. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней: СанПиН 3.3686-21: утверждены Главным

государственным санитарным врачом РФ 28.01.2021. – М.: Министерство юстиции Российской Федерации, 2021. – 1092 с.

134. Севрюков, Н.Н. Общая металлургия / Н.Н. Севрюков, Б.А. Кузьмин, Е.В. Челищев. – Москва: Металлургия, 1976. – 568 с.

135. Скопинская, С.Н. Применение флуоресцентного липосомного иммуноанализа для выявления антител к возбудителям туляремии, холеры, брюшного тифа, сапа и мелиоидоза / С.Н. Скопинская, С.П. Ярков, Е.Н. Храмов // Пробл. особ. опасн. инф. – 2007. – № 2 (94). – С. 67-71.

136. Старцева, О.Л. Анализ рисков при производстве и использовании медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляреминый лиофилизированный» / О.Л. Старцева, Ю.В. Богданова, Т.М. Гридина [и др.] // Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы: сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию академика И.Н. Блохиной. – Нижний Новгород: Медиаль, 2021. – С. 415-417.

137. Старцева, О.Л. Менеджмент риска при производстве и использовании медицинского изделия для диагностики *in vitro* набора реагентов «Диагностикум эритроцитарный антигенный туляреминый лиофилизированный» / О.Л. Старцева, Ю.В. Богданова, Т.М. Гридина [и др.] // Пробл. особ. опасн. инф. – 2022. – № 2. – С. 115-121.

138. Старцева, О.Л. Планирование процессов обеспечения качества при разработке новых диагностических препаратов / О.Л. Старцева, С.А. Курчева., А.А. Зуенко [и др.] // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2019. – С. 287-288.

139. Ступаков, В.С. Риск-менеджмент: учебное пособие / В.С. Ступаков, Г.С. Токаренко. – М.: Финансы и статистика, 2005. – 288 с.

140. Терешкина, Н.Е. Конструирование и медицинские испытания моноклональной дот-иммуноферментной тест-системы для детекции

туляремийного микроба «ДИАТул-М» / Н.Е. Терешкина, И.В. Терехова, Н.А. Сырова [и др.] // Пробл. особ. опасн. инф. – 2013. – № 2. – С. 42-45.

141. Тинкер, А.И. Влияние сублимационного (лиофильного) высушивания на штамм ЕВ чумного микроба: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 096 / Тинкер Александр Иосифович. – Саратов: [б. и.], 1971. – 38 с.

142. Тишков, С.В. Разработка состава и технологии лиофилизированных лекарственных форм на основе гексаметилендиамида бис-N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина: дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.01/ Тишков Сергей Валерьевич. – Москва, 2019. – 147 с.

143. Требования к организации и проведению внутреннего контроля качества и безопасности медицинской деятельности: приказ Министерства здравоохранения РФ от 07.07.2019 г. № 381н // Официальный интернет-портал правовой информации www.pravo.gov.ru. – 2019. – 5 сент. – С. 17.

144. Трохимчук, В.В. Методологические подходы к управлению рисками для качества в аптечных учреждениях / В.В. Трохимчук, С.Г. Убогов, В.А. Загорий // Рецепт. – 2018. – № 6 (21). – С. 872-882.

145. Тюменцева, И.С. Антигены и антисыворотки *Francisella tularensis*: к вопросу иммунодиагностики туляремии / И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, Е.В. Алиева [и др.] // Мед. вест. Северного Кавказа. – 2012. – № 1. – С. 49-52.

146. Тюменцева, И.С. Научно-методические разработки биотехнологий производства иммунобиологических препаратов для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний и детекции их возбудителей / И.С. Тюменцева, И.В. Жарникова, Е.Н. Афанасьев [и др.] // БИОпр. Проф., диагн., леч. – 2015. – № 4 (56). – С. 21-25.

147. Ульшина, Д.В. Программные решения для индикации и идентификации патогенных микроорганизмов методом времяпролетной масс-спектрометрии / Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, И.В. Кузнецова [и др.] // Пробл. особ. опасн. инф. – 2021. – № 3 – С. 40-50.

148. Управление рисками в системах нормативного регулирования [Электронный ресурс]: публикация. – Женева, 2014. – Режим доступа: https://unece.org/DAM/trade/Publications/WP6_ECE_TRADE_390R.pdf.

149. Уродовских, В.Н. Управление рисками предприятия: учебное пособие / В.Н. Уродовских. – М.: ИНФРА-М, 2011. – 168 с.

150. Федосов, Р.Н. Управление рисками промышленного предприятия: опыт и рекомендации / Р.Н. Федосова, О.Г. Крюкова. – М.: ЗАО «Издательство «Экономика», 2008. – 125 с.

151. Фоменков, О.О. Получение гибридом-продуцентов моноклональных антител к антигенам возбудителя туляремии / О.О. Фоменков, Г.Д. Елагин, Г.В. Куклина [и др.] // Пробл. особ. опасн. инф. – 2015. – № 2. – С. 92-94.

152. Хохлов, А.Л. Теоретические и практические основы проведения исследований воспроизведенных лекарственных препаратов: монография / А.Л. Хохлов, М. Рыска, В.Г. Кукес [и др.]; под ред. А.Л. Хохлова. – Москва-Ярославль-Прага: ООО Фотолэйф, 2017. – 227 с.

153. Хлебников, В.С. Изучение биохимических, антигенных и протективных свойств внешней мембраны возбудителя туляремии / В.С. Хлебников, И.Р. Головлев, Д.П. Кулевацкий [и др.] // Мол. генет., микробиол. и вирусол. – 1991. – № 7. – С. 15-20.

154. Чернова, Г.В. Управление рисками: учебное пособие / Г.В. Чернова, А.А. Кудрявцев. – М.: ТК Велби, изд-во Проспект, 2006. – 160 с.

155. Чернявская, Е.Г. Получение моноклональных антител к возбудителю туляремии и их применение в диагностике туляремийной инфекции: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Чернявская Елена Григорьевна. – Саратов, 1990. – 137 с.

156. Шепелёв, И.А. Оптимизация способа получения протективного «С»-комплекса туляремийного микроба / И.А. Шепелёв, О.А. Волох, С.А. Ерёмин [и др.] // Пробл. особ. опасн. инф. – 2006. – № 2 (92). – С. 61-64.

157. Шепелёв, И.А. Оптимизация условий культивирования *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в процессе получения поверхностного антигенного

комплекса / И.А. Шепелёв, И.А. Дятлов, О.А. Волох [и др.] // Молодые учёные в медицине: матер. IX Всесоюзная научно-практическая конф. – Казань, 2004. – С. 52.

158. Шепелёв, И.А. Оценка биокинетических и морфометрических показателей роста туляремийного микроба в процессе оптимизации получения клеточной массы / И.А. Шепелёв, И.А. Дятлов, О.А. Волох [и др.] // Пробл. особ. опасн. инф. – 2003. – № 85. – С. 157-163.

159. Эмануэль, А.В. Менеджмент рисков как основа системы менеджмента качества медицинской лаборатории / А.В. Эмануэль, Г.А. Иванов, О.В. Черничук, В.Л. Эмануэль, Ю.В. Эмануэль, Е.Д. Светалкина // Рем. Приволжье. – 2016. – № 144. – С. 27-31.

160. Эмануэль, А.В. Применение менеджмента рисков на основе стандарта ИСО 14971: методические подходы / А.В. Эмануэль, Г.А. Иванов, М.Д. Гейне // Вест. Росздрав. – 2013. – № 3. – С. 45-60.

161. Arakawa, T. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins / T. Arakawa, S.J. Prestrelski, W.C. Kenney [et al.] // Adv. Drug Deliv. – 2001. – Vol. 46. – P.307-26.

162. Aurelie, H. Sublimation kinetics during freeze-drying of pharmaceutical protein formulation / H. Aurelie, A. Julien, V. Severine // Drying Technology. – 2007. – Vol. 25 (4-6). – P. 753-758.

163. Barresi, A.A. Monitoring of the primary drying of a lyophilization process in vials / A.A. Barresi, R. Pisano, D. Fissore [et al.] // Chemical Engineering and Processing. – 2009. – Vol. 48. – P. 408-23.

164. Bhatti, A.R. Production and partial characterization of hybridoma clones secreting monoclonal antibodies against *Francisella tularensis* / A.R. Bhatti, J.P. Wong, D.E. Woods // Hybridoma. – 1993. – Vol. 12 (2). – P. 197-202.

165. Bolje, A. Analytical Techniques for Structural Characterization of Proteins in Solid Pharmaceutical Forms: An Overview. / A. Bolje, S. Gobec // Pharmaceutics. – 2021. – Vol. 13 (4). – P. 534.

166. Brown, S.L. Evaluation of a safranin-O-stained antigen microagglutination test for francisella tularensis antibodies / S.L. Brown, F.T. McKinney, G.C. Klein, W.L. Jones // *Clin Microbiol.* – 1980. – Vol. 11 (2). – P. 146-8.

167. Brulls, M. Heat transfer in vial lyophilization / M. Brulls, A. Rasmuson // *Int. J. Pharm.* – 2002. – Vol. 246 (1-2). – P. 1-16.

168. Cagol, N. Effect of Cryopreservation on Cell-Laden Hydrogels: Comparison of Different Cryoprotectants / N. Cagol, W. Bonani, D. Maniglio [et al.] // *Tissue Eng Part C Methods.* – 2018. – Vol. 1. – P. 20-31.

169. Carpenter, J.F. Separation of Freezing- and Drying-Induced Denaturation of Lyophilized Proteins Using Stress-Specific Stabilization: I. Enzyme Activity and Calorimetric Studies/ J.F. Carpenter, S.J. Prestrelski, T. Arakawa // *Arch Biochem Biophys.* – 1993. – Vol. 303 (2). – P. 456-64.

170. Chaignat, V. Performance of seven serological assays for diagnosing tularemia / V. Chaignat, M. Jordjevic-Spasic, A. Ruettinger [et al.] // *BMC Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 14. – P. 234.

171. Chang, B.S. Freeze–drying process development for protein pharmaceuticals / B.S. Chang, S.Y. Patro // *Biology.* – 2004. – P. 113–138.

172. Chang, B.S. Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants / B.S. Chang, B.S. Kendrick, J.F. Carpenter // *J Pharm Sci.* – 1996. – Vol. 85 (12). – P. 1325-30.

173. Chouvenc, P. Optimization of the freeze-drying cycle: adaptation of the Pressure Rise Analysis to non-instantaneous isolation valves / P. Chouvenc, S. Vessot, J. Andrieu, P. Vacus // *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology.* – 2005. – Vol. 59 (5). – P. 298-309.

174. Chouvenc, P. Optimization of the freeze-drying cycle: a new model for pressure rise analysis / P. Chouvenc, S. Vessot, J. Andrieu [et al.] // *Drying Technology.* – 2004. – Vol. 22. – P. 1577-1601.

175. Crowe, J.H. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules / J.H.

Crowe, J.F. Carpenter, L.M. Crowe, T.J. Anchordoguy // *Cryobiology*. – 1990. – Vol. 27 (3). – P. 219-31.

176. Crowe, L.M. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? / L.M. Crowe, D.S. Reid, J.H. Crowe // *Biophys J*. – 1996. – Vol. 71 (4). – P. 2087-93.

177. Das, A. Quality risk management (QRM) in pharmaceutical industry: Tools and methodology / A. Das, P. Kadwey, J.K. Mishra, S. Moorkoth // *International journal of innovative research in technology*. – 2020. – Vol. 7. – P. 811-16.

178. Gan, K.H Freeze-drying of pharmaceuticals in vials on trays: effects of drying chamber wall temperature and tray side on lyophilization performance / K.H. Gan, R. Bruttini, O.K. Crosser [et al.] // *International Journal of Heat and Mass Transfer*. – 2005. – Vol. 48 (9). – P. 1675-87.

179. Guimarães, D. Quantification of drugs encapsulated in liposomes by ¹H NMR / D. Guimarães, J. Noro, A. Loureiro [et al.] // *Colloids Surf B Biointerfaces*. – 2019. – Vol. 179. – P. 414-420.

180. Haeuser, C. Impact of dextran on thermal properties, product quality attributes, and monoclonal antibody stability in freeze-dried formulations / C. Haeuser, P. Goldbach, J. Huwyler, W. Friess, A. Allmendinger. // *Eur J Pharm Biopharm*. – 2020. – Vol. 147. – C. 45-56.

181. Han, Y. Effects of sugar additives on protein stability of recombinant human serum albumin during lyophilization and storage. / Y. Han, B.S. Jin, S.B. Lee, Y. Sohn, J.W. Joung, J.H. Lee // *Arch Pharm Res*. – 2007. – Vol. 30 (9). – P. 1124-31.

182. Hottot, A. Freeze drying of pharmaceutical proteins in vials: modeling of freezing and sublimation steps / A. Hottot, R. Peczalski, S. Vessot [et al.] // *Drying Technol*. – 2006. – Vol. 24. – P. 561-70.

183. Hottot, A. Freeze drying of pharmaceuticals in vials: Influence of freezing protocol and sample configuration on ice morphology and freeze-dried cake texture / A. Hottot, S. Vessot, J. Andrieu // *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. – 2007. – Vol. 46 (7). – P. 666-74.

184. Izutsu, KI. Applications of Freezing and Freeze-Drying in Pharmaceutical Formulations / KI. Izutsu // *Adv Exp Med Biol*. – 2018. – Vol. 1081. – P. 371-383.

185. Izutsu, K.I. Increased Stabilizing Effects of Amphiphilic Excipients on Freeze-Drying of Lactate Dehydrogenase (LDH) by Dispersion into Sugar Matrices / K.I. Izutsu, S. Yoshioka, S. Kojima // Pharm Res. – 1995. – Vol. 12 (6). – P. 838-43.

186. Jensen, T. Influence of freeze-drying on the clotting properties of fibrinogen in plasma / T. Jensen, S. Halvorsen, H. Godal, O. Skjønberg // Thromb Res. – 2002. – Vol. 105 (6). – P. 499-502.

187. Kasper, J.C. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals / J.C. Kasper, W. Friess // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2011. – Vol. 78. – P. 248-263.

188. Khandagale, P.M. Lyophilization Technique: A Review / P.M. Khandagale, B. Bhairav, R.B. Saudagar // Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science. – 2016. – Vol. 6 (4). – P. 269-276.

189. Kumar N. Quality risk management during pharmaceutical 'good distribution practices' – A plausible solution / N. Kumar, A. Jha // Bulletin of Faculty of Pharmacy Cairo University. – 2017. – Vol. 56 (1). – P. 1-8.

190. Levi, M.I. Reaction of passive hemagglutination and reaction of antibody neutralization in some infections / M.I. Levi, N.N. Basova, I.G. Suchkov, G. Orlova, L.G. Gerasiuk, A. Momot // Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii. – 1962. – Vol. 10. – P.40-45.

191. Massey, E.D. Microagglutination test for detecting and measuring serum agglutinins of *Francisella tularensis* / E.D. Massey, J.A. Mangiafico // Appl Microbiol. – 1974. – Vol. 27 (1). – P. 25-7.

192. Maurin, M. *Francisella tularensis*, Tularemia and Serological Diagnosis / M. Maurin // Front Cell Infect Microbiol. - 2020. - № 10. - P. 512090.

193. Murray, P. How To strengthen risk management practices in the pharmaceuticals supply Chain / P. Murray // Pharm. Online Newslett. – 2015. – P. 1-3.

194. Nagdalian, A.A. Analysis of the content of mechanically separated poultry meat in sausage using computing microtomography / A.A. Nagdalian, I.V.

Rzhepakovsky, S.A. Siddiqui [et al.] // *J. Food Compos. Anal.* – 2021. – Vol. 100. – P. 103918.

195. Nasran, H.S. Optimization of Protective Agents for The Freeze-Drying of *Paenibacillus polymyxa* Kp10 as a Potential Biofungicide / H.S. Nasran, H. Mohd Yusof, M. Halim, N. Abdul Rahman // *Molecules.* – 2020. – Vol. 11 (25). – P. 2618.

196. Nielsen, K. Fluorescence Polarization Immunoassay: Detection of Antibody to *Brucella abortus* / K. Nielsen, M. Lin, D. Gall, M. Jolley // *Methods.* – 2000. – Vol. 22 (1). – P. 71-76.

197. Odds, F.C. Activities of an intravenous formulation of itraconazole in experimental disseminated *Aspergillus*, *Candida*, and *Cryptococcus* infections / F.C. Odds, M. Oris, P. Van Dorsselaer, F. Van Gerven // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2000. – Vol. 44 (11). – P. 3180-3.

198. Ojha, T. Lyophilization stabilizes clinical-stage core-crosslinked polymeric micelles to overcome cold chain supply challenges / T. Ojha, Q. Hu, C. Colombo [et al.] // *Biotechnology.* – 2021. – Vol. 16 (6). – P. e2000212.

199. Orhan, K. Micro-computed tomography (micro-CT) in medicine and engineering. / K. Orhan. – Berlin: Springer Nature Switzerland AG, 2020. – 312 p.

200. Ouchterlony, O. Antigen-antibody reactions in gel / O. Ouchterlony // *Arkiv. for Kemi Mineral. o. Geol.* – 1949. – Vol. 261 (14). – P. 1-9.

201. Ozerov, E.S. Selecting the best use option for assets in a corporate management system / E.S. Ozerov, S.V. Pupentsova, V.A. Leventsov, M.S. Dyachkov // *Reliability, infocom technologies and optimization (trends and future directions): article in the proceedings of the conference, Noida, India, september 20-22, 2017.* – 6th International Conference ICRITO, 2017. – P. 162-170.

202. Polson, A. The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight / A. Polson, G.M. Potgieter, J.E. Largier // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1964. – Vol. 82. – P. 463–475.

203. Porsch-Ozcürümez, M. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia / M. Porsch-Ozcürümez, N.

Kischel, H. Priebe [et al.] // Clin Diagn Lab Immunol. – 2004. – Vol. 11 (6). – P. 1008-15.

204. Prestrelski, S.J. Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization: II. Structural studies using infrared spectroscopy / S.J. Prestrelski, T. Arakawa, J.F. Carpenter // Arch Biochem Biophys. – 1993. – Vol. 303 (2). – P. 465-73.

205. Rastawicki, W. Development and evaluation of a latex agglutination test for the rapid serodiagnosis of tularemia / W. Rastawicki, N. Rokosz-Chudziak, A. Chróst, R. Gierczyński // Microbiol. Method. – 2015. – Vol. 112. – P. 1-2.

206. Rastawicki, W. Development and Evaluation of a Latex Agglutination Test for the Identification of *Francisella tularensis* Subspecies Pathogenic for Human / W. Rastawicki, K. Forminska, A. Zasada // Polish Journal of Microbiology. – 2018. – Vol. 67 (2). – P. 241-244.

207. Rey, L. R. Traité de lyophilisation / L. R. Rey. – Paris: Hermann, 1960. – 411 p.

208. Roth, C. Continuous measurement of drying rate of crystalline and amorphous systems during freeze-drying using an in situ microbalance technique / C. Roth, G. Winter, G. Lee // Journal of Pharmaceutical Science. – 2001. – Vol. 90. – P. 1345-55.

209. Schmitt, P. A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularemia / P. Schmitt, W. Splettstösser, M. Porsch-Ozcürümez [et al.] // Epidemiol Infect. – 2005. – Vol. 133 (4). – P. 759-66.

210. Searles, J.A. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate, and determine Tg in pharmaceutical lyophilization / J.A. Searles, J.A., J.F. Carpenter, T.W. Randolph // J. Pharm. Sci. – 2001. – Vol. 90. – P. 872-87.

211. Sharma, N. Detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in patients with tularemia by a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay / N. Sharma, A. Hotta, Y. Yamamoto [et al.] // Clin Vaccine Immunol. – 2013. – Vol. 20 (1). – P. 9-16.

212. Song, J.G. Biophysical evaluation of aminoclay as an effective protectant for protein stabilization during freeze-drying and storage / J.G. Song, S.H. Lee, H.-K. Han // *Int J Nanomedicine*. – 2016. – Vol. 11. – P. 6609-19.

213. Spletstoeser, W.D. Diagnostic procedures in tularemia with special focus on molecular and immunological techniques / W.D. Spletstoeser, H. Tomaso, S. Al Dahouk, H. Neubauer, P. Schuff-Werner // *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. – 2005. – Vol. 52. – P. 249-261.

214. Spletstoeser, W. Evaluation of an immunochromatographic test for rapid and reliable serodiagnosis of human tularemia and detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in sera from different mammalian species / W. Spletstoeser, V. Guglielmo-Viret, E. Seibold, P. Thullier // *Clin Microbiol*. – 2010. – Vol. 48 (5). – P. 1629-34.

215. Steibuch, G. The isolation of IgG from imanalion serra with the acid of caprylic / G. Steibuch, R. Andran // *Arch. of Biochem. Stray and Biophys*. – 1969. – Vol. 139. – P. 279–284.

216. Suverkrup, R.J. Fast Precise Freeze Drying of Hyaluronic Acid/Dextran Ophthalmic Lyophilisate Carrier Systems (OLCS) / R.J. Suverkrup, O. Krasichkova, M. Diestelhorst // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2006. – Vol. 47 (13). – P. 5130-5130.

217. Tang, M. Effect of pre-freezing and saccharide types in freeze-drying of siRNA lipoplexes on gene-silencing effects in the cells by reverse transfection / M. Tang, S. Hu, Y. Hattori // *Mol Med Rep*. – 2020. – Vol. 22 (4). – P. 3233-44.

218. Tsinontides, S.C. Freeze drying--principles and practice for successful scale-up to manufacturing / S.C. Tsinontides, P. Rajniak, D. Pham [et al.] // *Int. J. Pharm*. – 2004 – Vol. 280 (1-2). – P. 1-16.

219. Varshney, D.B. Phase transitions in frozen systems and during freeze-drying: quantification using synchrotron X-ray diffractometry / D.B. Varshney, P. Sundaramurthi, S. Kumar [et al.] // *Pharm Res*. – 2009. – Vol. 26 (7). – P. 1596-606.

220. Wei, W. Issues in Freeze Drying of Aqueous Solutions / W. Wei, C. Mo, C. Guohua // *Chinese Journal of Chemical Engineering*. – 2012. – Vol. 20 (3). – P. 551-9.

221. Weller, T.H. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro / T.H. Weller, A.H. Coons // *Proc. Soc. Exp. Biol.* – 1954. – Vol. 86. – P. 789-794.

222. Westphal, O. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further application of the procedure / O. Westphal, K. Jann // *Methods in Carbohydrate Chemistry.* – 1965. – Vol. 5. – P. 83-91.

223. Yanes, H. Evaluation of In-House and Commercial Serological Tests for Diagnosis of Human Tularemia / H. Yanes, A. Hennebique, I. Pelloux [et al.] // *Clin Microbiol.* – 2017. – Vol. 56 (1). – P. e01440-17.

224. Zhao, Y. Optimization of Heat-Resistance Technology for a Duck Hepatitis Lyophilized Live Vaccine / Y. Zhao, B. Deng, X. Pan [et al.] // *Vaccines.* – 2022. – Vol. 10 (2). – P. 269.

225. Zhu, Z. Pressure-related cooling and freezing techniques for the food industry: fundamentals and applications / Z. Zhu, T. Li, D.-W. Sun // *Crit Rev Food Sci Nutr.* – 2021. – Vol. 61 (17). – P. 2793-2808.

226. Zlenko, O.B. Development of recombinant antigen-based elisa for the detection of anti-tularemia antibodies in swine and human sera: a pilot study / O.B. Zlenko, C. Popp, H. von Buttlar [et al.] // *Biotechnol. Acta.* – 2020. – Vol. 1. – P. 45-54.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2708636

**УНИВЕРСАЛЬНАЯ СРЕДА ВЫСУШИВАНИЯ ДЛЯ
СТАБИЛИЗАЦИИ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ ТУЛЯРЕМИЙНЫХ**

Патентообладатель: *Федеральное казённое учреждение
здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский
институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2019124600

Приоритет изобретения 30 июля 2019 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 10 декабря 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 30 июля 2039 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2747420

СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЭРИТРОЦИТАРНОГО
ДИАГНОСТИКУМА ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО
ТУЛЯРЕМИЙНОГО

Патентообладатель: *Федеральное казённое учреждение здравоохранения
"Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт"
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека (RU)*


Авторы: *Жарникова Ирина Викторовна (RU), Кошкидько Александра
Геннадьевна (RU), Курчева Светлана Александровна (RU), Жданова Елена
Владимировна (RU), Старцева Ольга Леонидовна (RU), Тюменцева Ирина
Степановна (RU), Афанасьев Евгений Николаевич (RU), Семирчева
Анастасия Александровна (RU), Геогджаян Анна Самвеловна (RU),
Красовская Татьяна Леонидовна (RU)*

Заявка № 2020124885

Приоритет изобретения 17 июля 2020 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 04 мая 2021 г.Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 17 июля 2040 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности



Г.П. Иевлев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2749355

СПОСОБ ЛИОФИЛИЗАЦИИ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ ТУЛЯРЕМИЙНЫХ

Патентообладатель: *Федеральное казённое учреждение здравоохранения "Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU)*

Авторы: *Кошкидько Александра Геннадьевна (RU), Жарникова Ирина Викторовна (RU), Курчева Светлана Александровна (RU), Жданова Елена Владимировна (RU), Семирчева Анастасия Александровна (RU), Геогджаян Анна Самвеловна (RU), Жарникова Татьяна Владимировна (RU), Старцева Ольга Леонидовна (RU), Богданова Юлия Викторовна (RU)*


Заявка № 2020124880

Приоритет изобретения 17 июля 2020 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 09 июня 2021 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 17 июля 2040 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Ивлиев



ОКПД2 21.20.23.111

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФКУЗ Ставропольский
профилактический институт
эпидемиологии



И. Куличенко

2020 г.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ**НАБОР РЕАГЕНТОВ
ДИАГНОСТИКУМ ЭРИТРОЦИТАРНЫЙ
ТУЛЯРЕМИЙНЫЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЙ СУХОЙ
(«ДЭТ-Иг»)****ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ
ТУ 21.20.23-056-01897080-2020**

Срок действия не ограничен





2020 г.

УТВЕРЖДАЮ
 Директор ФКУЗ Ставропольский
 противочумный
 Роспотребнадзор
 Куличенко А.Н.



Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляреимийный иммуног («ДЭТ-Иг»)

Текст маркировки вторичной упаковки

Обратная сторона	Левая боковая сторона	Лицевая сторона	Правая боковая сторона
<p>В состав набора реагентов входят:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Диагностикум эритроцитарный туляреимийный амбулобуллиновый 10% сухой - 4 ампл. (1 ампл.); - вспомогательный контрольный образец, инaktivированный (K+) сухой - 1 ампл. (1 ампл.); - стандартная диагностическая туляреимийная эритроцитарная сухая - 1 ампл. (1 ампл.); - Инструкция по применению - 1 шт.; - Сертифицирован дисконий ампульный перчаточеский - 1 шт. <p>Специфическая активность в РНГА:</p> <ul style="list-style-type: none"> > макропазодом 3,12 × 10⁶ м.к.мл > микропазодом 6,25 × 10⁶ м.к.мл <p>Серия  </p>	<p>Регистрационный номер Дата регистрации</p> <p>ТУ 21.20.23-056-01897080-2020</p>	<p> Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский и научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека</p> <p>ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзор 355033, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15, E-mail: stw@frcb@mail.ru Тел/факс: (865-2) 26-03-12</p> <p>Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляреимийный иммуног амбуллиновый сухой («ДЭТ-Иг»)</p> <p> МОН СТЕРИЛЬЕ</p> <p>Только для диагностики <i>in vitro</i></p>	<p>Транспортирование при температуре от 2 до 8°C. Допускается транспортирование при температуре до 37°C не более 30сут.</p>

Зав. лабораторией
 Русанова Д.В.

Handwritten signature

Согласовано:
 Зав. ЛБТК
 Старцева О.Л.

Handwritten signature



**Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляремийный
 иммуноглобулиновый сухой
 («ДЭТ-Иг»)**

Текст маркировки первичной упаковки

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора Диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый 10 % Серия № Количество: 1,0 мл Годен до:	ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора Положительный контрольный образец инактивированный (К+) сухой Серия № Количество: 1,0 мл Годен до:	ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора Сыворотка диагностическая туляремийная адсорбированная сухая Серия № Количество: 1,0 мл Годен до:
--	--	--

Зав. лабораторией



Русанова Д.В.

Согласовано:
 Зав. ЛБТК



Старцева О.Л.



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДИАГНОСТИКУМ ЭРИТРОЦИТАРНЫЙ
ТУЛЯРЕМИЙНЫЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЙ СУХОЙ
(«ДЭТ-Иг»)**

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов -диагностикум эритроцитарный туляремиийный иммуноглобулиновый сухой («ДЭТ-Иг») (далее по тексту – набор) предназначен для качественного определения возбудителя туляремии в бактериальных культурах, биологическом материале и объектах окружающей среды в реакции непрямой агглютинации (РНГА).

Туляремия – зооноз, поражающий более 150 видов грызунов. Это природно-очаговая инфекция, широко распространенная в различных регионах России. Возбудитель туляремии (*F. tularensis*) патогенности относится к микроорганизмам II группы, выделение и идентификация которых может производиться в специально оборудованных лабораториях подготовленными специалистами, вакцинированными против туляремии.

Туляремия передается человеку контактным (при вскрытии грызунов, при контакте с зараженной водой), алиментарным (при употреблении загрязненной грызунами пищи и воды) и аспирационным путем (при вдыхании пыли, например, при обмолоте загрязненных зерновых культур). Возбудитель может передаваться также кровососущими и другими членистоногими (клещами, блохами, комарами, слепнями, мухами-жигалками). Человек при туляремии является эпидемиологическим тупиком.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика, научные исследования, эпидемиологический надзор.

Потенциальные потребители препарата – специализированные лаборатории учреждений, осуществляющие санитарно-эпидемиологический надзор за туляремией в Российской Федерации, лечебно-профилактических и противочумных учреждений.

Показания – подозрение на инфицирование (контаминацию) возбудителем туляремии (*F. tularensis*).

Противопоказаний к применению препарата – нет.

Применение РНГА для серологических исследований, направленных на поиск специфических антител к *F. tularensis* в сыворотках крови человека регламентировано СП 3.1.7.2642-10 «Профилактика туляремии» (утверждены

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФКУЗ Ставропольский
противочумный институт
Роспотребнадзора
А.Н. Куличенко
20 20 г.



ПУСКОВОЙ РЕГЛАМЕНТ № 01897080-37-20

на производство

**НАБОР РЕАГЕНТОВ
ДИАГНОСТИКУМ ЭРИТРОЦИТАРНЫЙ
ТУЛЯРЕМИЙНЫЙ АНТИГЕННЫЙ СУХОЙ
(«ДЭТ-Аг»)**

Срок действия регламента

до «___» _____ 20 ___ г.

ОКПД2 21.20.23.111

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФКУЗ Ставропольский
профилактический институт
Роспотребнадзора



И. Куличенко

2020 г.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ**НАБОР РЕАГЕНТОВ
ДИАГНОСТИКУМ ЭРИТРОЦИТАРНЫЙ
ТУЛЯРЕМИЙНЫЙ АНТИГЕННЫЙ СУХОЙ
(«ДЭТ-Аг»)****ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ
ТУ 21.20.23-055-01897080-2020**






Срок действия не ограничен

2020 г.



Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляреимный антигенный сухой («ДЭТ-Аг»)

Текст маркировки вторичной упаковки

Обратная сторона	Левая боковая сторона	Лицевая сторона	Правая боковая сторона
<p>В состав набора реагентов входят:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Диагностикум эритроцитарный туляреимный антигенный 10% сухой - эритроциты барана 50 % сухой - полимерный контрольный образец шактинорезаный (КС) сухой - вазель <i>Eligents</i>, инкапсулованная сухая - инструкция по применению - сертификат дисковой ампульный керологический <p>Специфическая активность в РИГА: > <i>Leptospira</i> 1:20000 > <i>Shigella</i> 1:10000</p> <p>Серия   </p>	<p>Регистрационный номер Дата регистрации</p> <p>ТУ 21.20.23-055-01897080-2020</p>	<p> Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора 355 03 5, Бесен, г. Ставрополь, Ул. Советская, д. 13-15, E-mail: svp@pch@mail.ru Тел/факс: (865-2) 26-03-12</p> <p>Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляреимный антигенный сухой («ДЭТ-Аг»)</p> <p></p> <p>Только для диагностики <i>In vitro</i></p>	<p>Транспортирование при температуре от 2 до 8°C. Допускается транспортирование при температуре до 37 °C не более 30 сут.</p>

Зав. лабораторией
Согласовано:
Зав. ЛБТК




Русанова Д.В.
Старцева О.Л.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФКУЗ Ставропольский
противочумный институт
РоспотребнадзораКаличенко А.Н.
2020г.

**Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный сухой
(«ДЭТ-Аг»)**

Текст маркировки первичной упаковки

<p align="center">ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора</p> <p align="center">Положительный контрольный образец инактивированный (К+) сухой</p> <p><i>Серия №</i> <i>Количество:</i> 1,0 мл <i>Годен до:</i> Условия хранения от 2 до 8 °С Только для диагностики <i>in vitro</i></p>	<p align="center">ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора</p> <p align="center">Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный 10 %</p> <p><i>Серия №</i> <i>Количество:</i> 1,0 мл <i>Годен до:</i> Условия хранения от 2 до 8 °С Только для диагностики <i>in vitro</i></p>	<p align="center">ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора</p> <p align="center">Эритроциты барана 50 %</p> <p><i>Серия №</i> <i>Количество:</i> 2,0 мл <i>Годен до:</i></p> <p>Условия хранения от 2 до 8 °С Только для диагностики <i>in vitro</i></p>	<p align="center">ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора</p> <p align="center">Взвесь <i>F.tularensis</i>, инактивированная сухая</p> <p><i>Серия №</i> <i>Количество:</i> 1,0 мл <i>Годен до:</i></p> <p>Условия хранения от 2 до 8 °С Только для диагностики <i>in vitro</i></p>
--	---	--	--

Зав. лабораторией

Согласовано:
Зав. ЛБТК

Русанова Д.В.

Старцева О.Л.

УТВЕРЖДАЮ
 Директор ФКУЗ
 Ставропольский
 противочумный институт
 государственного
 санитарно-эпидемиологического
 надзора
 А.Н. Зеличенко
 20 20 г.



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
 НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДИАГНОСТИКУМ ЭРИТРОЦИТАРНЫЙ
 ТУЛЯРЕМИЙНЫЙ АНТИГЕННЫЙ СУХОЙ
 («ДЭТ-Аг»)**

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляреминый антигенный сухой («ДЭТ-Аг») (далее по тексту – набор) предназначен для анализа сыворотки крови человека на наличие специфических антител к *F. tularensis* в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА).

Область применения – клиническая лабораторная диагностика, научные исследования, эпидемиологический надзор.

Потенциальные потребители препарата – специализированные лаборатории учреждений, осуществляющие санитарно-эпидемиологический надзор за туляремией в Российской Федерации, лечебно-профилактических и противочумных учреждений.

Показания – подозрение на инфицирование возбудителем туляремии (*F. tularensis*).

Противопоказаний к применению препарата – нет.

Применение РНГА для серологических исследований, направленных на поиск специфических антител к *F. tularensis* в сыворотках крови человека регламентировано СП 3.1.7.2642-10 «Профилактика туляремии» (утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 31.05.2010 г. № 61).

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Компонентный состав

Диагностикум эритроцитарный туляреминый антигенный сухой 10% представляет собой лиофилизированные в среде высушивания эритроциты барана, сенсibilизированные водорастворимым антигеном туляреминого микроба.

Эритроциты барана 50 % сухие представляют собой формализованные несенсibilизированные эритроциты барана, лиофилизированные в среде высушивания.

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 // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2019. – № 15 (4). – С. 27-31. ИФ = 0,108.

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 // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2020. – № 16 (4). – С. 12-16. ИФ = 0,108.

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 // Проблемы особо опасных инфекций. – 2021. – № 4. – С. 79-83. ИФ= 1,285 CAS. [https://doi.org/ DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-79-83](https://doi.org/DOI:10.21055/0370-1069-2021-4-79-83).

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 // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – № 2. – С. 115-121. ИФ= 1,285 CAS. [https://doi.org/ DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-94-100](https://doi.org/DOI:10.21055/0370-1069-2022-2-94-100).

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 // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2022. – № 22

(2). – С. 196-207. ИФ = 0,719 CAS. [https://doi.org/ 10.30895/2221-996X-2022-22-2-196-207](https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-196-207).

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 // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2023. – № 19 (2). – С. 6-12. ИФ = 0,108.

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 ; заявитель и 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 ; заявитель и 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 ; заявитель и патентообладатель ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2020124880; заявл. 17.07.2020; опубл. 09.06.2021; Бюл. № 16. – 9 с.

Другие публикации:

1. Курчева, С.А. Биотехнологические разработки стабилизации диагностикума эритроцитарного туляреминого / 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 туляреминого 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 всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции 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 туляреминый 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: сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции 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 туляреминого 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 – Издательство 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: сборник трудов 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: материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции 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: материалы VII Национального конгресса бактериологов, посвященного 100-летию со дня образования Государственной санитарной службы России, 28–30 сентября 2022 г., Санкт-Петербург – Издательство «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** // Вестник молодого ученого. – 2022. – № 3. – С. 90-93.