

© Гаркуша Ю.Ю., Тюменцева И.С., Курчева С.А., Старцева О.Л., Жарникова И.В., Кошкидько А.Г., Геогджаян А.С., 2018

УДК 57.088.2:006.015.5: 57.083.12

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ОСНОВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА МАГНОСОРБЕНТА

Ю.Ю. Гаркуша, И.С. Тюменцева, С.А. Курчева, О.Л. Старцева,
И.В. Жарникова, А.Г. Кошкидько, А.С. Геогджаян

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора,
ул. Советская, 13–15, г. Ставрополь, 355035, Росси

Представлены материалы по изучению стабильности основных показателей качества пяти экспериментальных серий стандартного образца магносорбента ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора (рег. № 007-9388-2015).

Установлено сохранение стабильности характеристик СО МС без изменения внешнего вида и потери адсорбционной активности в течение всего срока наблюдения. Применение стандартного образца магносорбента в качестве магнитной матрицы позволит оптимизировать технологический процесс производства, получая точные и сопоставимые результаты, значительно повысив биологические характеристики разрабатываемых новых или выпускаемых магноиммуносорбентных диагностических препаратов.

Результаты проведенных исследований по стабильности аттестуемых характеристик в процессе хранения позволяют рекомендовать гарантийный срок хранения СО МС – 3 года.

Ключевые слова: стандартный образец, магнитные сорбенты, стабильность.

Yu.Yu. Garkusha, I.S. Tyumentseva, S.A. Kurcheva, O.L. Startseva, I.V. Zharnikova, A.G. Koshkid'ko, A.S. Geogdzhayan □ **DETERMINATION OF STABILITY OF THE MAJOR QUALITY PARAMETERS OF MAGNOSORBENT STANDARD SAMPLE** □ Stavropol Antiplague Institute of Rospotrebnadzor, 13–15, Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russia.

The article presents the materials on the study of stability of the major quality parameters of five experimental series of standard sample of magnosorbent from Stavropol Antiplague Institute of Rospotrebnadzor (registration No. 007-9388-2015). Persistence of stability of the magnosorbent standard sample parameters has been confirmed, without changes in appearance and without loss of adsorption intensity through the whole period of observations. Applying a standard sample of magnosorbent as a magnetic matrix will allow to optimize the production process obtaining precise and comparable results, considerably improving the biological parameters of newly-developed or already produced magnoimmunosorbent products for diagnostics.

The results of the performed study of stability of the assessed parameters in the process of storage allow to recommend a 3-year warranty shelf life of the magnosorbent standard sample.

Key words: standard sample, magnetic sorbents, stability.

Магнитная сепарация клеток становится стандартным и широко используемым методом, дающим надежные и воспроизводимые результаты, применяемым как для научных и санитарно-эпидемиологических исследований, так и в лабораторной практике для диагностики инфекционных болезней там, где требуется высокочувствительная детекция микроорганизмов в сложных контаминированных и загрязненных ингибиторами образцах с низкой концентрацией патогена [2, 5, 7].

Исследования в этой области способствовали внедрению в практику магноиммуносорбентных (МИС) препаратов, основанных на использовании магнитных сорбентов с антителами, маркерными белками, либо иными лигандами, иммобилизованными на их поверхности. Сорбенты чаще всего изготавливают из различных полимерных материалов, таких как оксид кремния, агароза, полистирол, хитин, вермикулит и др. Особую нишу среди материалов, используемых для изготовления сорбентов, занимают кремнеземы, которые представляют собой морфологически совершенные жесткие мезопористые каркасные структуры. Введение в состав кремнеземных сорбентов оксидов металлов придает дополнительные свойства их поверхностным структурам, а их частицы приобретают магнитный потенциал [1, 3, 8].

С целью оптимизации производства магноиммуносорбентных диагностических препаратов была проведена работа по изготовлению стандартного образца магносорбента (СО МС), предназначенного для конструирования МИС. Приготовление СО МС проводили по ранее разработанной методике, заключающейся в формировании структуры носителя в присутствии органического полимера [1, 8]. Использование СО МС в качестве магнитной матрицы МИС при разработке новых или выпуске коммерческих МИБП значительно повысит их биологические характеристики и, как следствие, достоверность результатов проводимых лабораторных исследований.

Оценка эффективности и стабильности основных показателей качества необходима для внедрения разработанного препарата в практику, так как является одним из требований, предъявляемых к стандартным образцам МИБП [5, 6].

Цель исследования – определение стабильности основных показателей качества стандартного образца магносорбента ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора.

Материалы и методы. Стандартный образец магносорбента ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора (рег. № 007-9388-2015) представляет собой смесь алюминия метасиликата и оксида железа (II), моди-

фицированную 6 % коллоидным раствором декстрана с молекулярной массой $60\,000 \pm 10\,000$ в 0,9 % растворе натрия хлорида и активированную натрием периодатом. Поверхность частиц СО МС содержит активные функциональные группы, способные к иммобилизации IgG в количестве 10 мг на 1,0 г сорбента. Один флакон СО МС рассчитан на изготовление 4,0 мл 10 % взвеси МИС.

Для определения специфической активности препаратов, сконструированных с применением иммобилизованного СО МС, был использован набор реагентов тест-система иммуноферментная магнoиммунoсорбентная для выявления возбудителя туляремии («ИФА-МИС-Тул-СтавНИПЧИ») № РЗН 2013/429.

Основным показателем, характеризующим эффективность сорбентов, является их адсорбционная емкость; эффективность процесса адсорбции оценивали по степени извлечения IgG из водной суспензии МС.

Для определения стабильности препаратов использовали два вида испытаний: ускоренные и долгосрочные (в реальном времени) [4].

Сущность классического метода (долговременной стабильности) заключается в том, что испытываемые образцы выдерживают при постоянной температуре рекомендованного хранения в течение периода, перекрывающего предполагаемый срок годности. Через определенные промежутки времени оценивают стабильность установленных параметров хранящегося образца. На основании окончательных результатов анализа делают заключение об оптимальном сроке хранения.

Наиболее распространен метод «ускоренного старения», позволяющий за несколько коротких интервалов исследования прогнозировать сроки годности готового препарата.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel 2007 для уровня вероятности не менее 95 %.

Результаты исследования. При исследовании стабильности основных показателей качества СО МС методом «ускоренного старения» образцы выдерживали в термостате при температуре $(58 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 14 и 21 сут.,

что соответствует 36 и 60 мес. хранения при рекомендованной температуре. Контроль показателей качества СО МС проводили по истечении указанного временного интервала.

Параллельно проводили исследование долговременной стабильности, выдерживая образцы при температурах $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ и $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$ в течение 48 мес. Контроль по показателям качества СО МС проводили через каждые три месяца в течение первого года хранения, каждые шесть месяцев в течение второго года хранения и ежегодно на протяжении последующего периода испытаний.

Качество экспериментальных серий СО МС в различные сроки их хранения оценивали по аттестуемым показателям, соответствующих требованиям нормативной документации (табл. 1).

Контроль внешнего вида: определение проводили визуально при естественном освещении. По внешнему виду СО МС представлял собой гомогенную суспензию черного цвета без признаков конгломерации. При отстаивании образовывался черный осадок на дне флакона и бесцветная прозрачная надосадочная жидкость.

Контроль pH: определение проводили потенциометрически на pH-метре. Для контроля использовали содержимое трех флаконов от каждой серии. Измерения показали, что pH находится в пределах 6,8–7,2 ед.

Контроль размера частиц: из трех флаконов пяти серий с помощью дозатора отбирали по 10 мкл суспензии магносорбента, ресуспендировали его в 10 мкл дистиллированной воды. Взвесь наносили на предметное стекло, высушивали и просматривали на биологическом микроскопе «MeijiTechno MT6000» при увеличении $\times 40$, определяли размер отдельно расположенных частиц. Изображение частиц просматривали на экране. За результат контроля принимали среднее арифметическое значение результатов десяти измерений. По данным микроскопии, СО МС – высокодисперсные микрогранулы неправильной формы с выраженными магнитными свойствами, обладающие хорошей смачиваемостью и эффективным оседанием в растворе. Размер частиц варьирует от 3,3 до 4,3 мкм.

Таблица 1. Аттестованные показатели пяти серий стандартного образца магносорбента на момент изготовления

Table 1. Certified indicators of the five series of a standard sample of magnosorbent at time of manufacture

Наименование показателя	Требования НД	Полученные результаты				
		Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 4	Серия 5
Внешний вид	При перемешивании образуется гомогенная взвесь черного цвета, при отстаивании – бесцветная прозрачная надосадочная жидкость с черным осадком на дне флакона	При перемешивании во всех образцах трех серий образовывалась гомогенная взвесь черного цвета, при отстаивании – бесцветная прозрачная надосадочная жидкость с черным осадком на дне флакона				
pH	$7,0 \pm 0,2$	6,9 6,9 7,0	6,9 7,0 7,0	7,0 7,0 6,9	7,1 7,1 7,1	7,0 7,1 7,0
Размер частиц, мкм*	$3,8 \pm 0,5$	$3,7 \pm 0,3$ $3,8 \pm 0,3$ $3,8 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,3$ $3,7 \pm 0,3$ $3,8 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,3$ $3,9 \pm 0,3$ $3,9 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,2$ $3,8 \pm 0,3$ $3,9 \pm 0,4$	$3,8 \pm 0,3$ $3,8 \pm 0,3$ $3,9 \pm 0,3$
Адсорбционная активность, мг/мл	$1,0 \pm 0,2$	1,0 1,0 1,02	1,1 1,0 1,0	0,98 0,98 0,99	0,9 0,9 0,91	1,05 1,02 1,02

* Размер частиц контролируется только на момент изготовления.

* The particle size is controlled only at the time of manufacture.

Контроль адсорбционной активности МС изучали путем иммобилизации на его поверхности IgG, выделенных из гипериммунных кроличьих сывороток. Контроль проводили на примере туляремийных иммуноглобулинов. Для контроля использовали по три флакона от каждой серии. Для этого из флаконов удаляли надосадочную жидкость, в каждый флакон добавляли 2,0 мл раствора IgG, инкубировали при температуре $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$ в течение (120 ± 10) мин, периодически перемешивая. МС отстаивали в течение (15 ± 1) мин при температуре $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$. Надосадочную жидкость фильтровали через бумажный фильтр и использовали для контроля адсорбционной активности. Эффективность процесса оценивали по степени извлечения IgG из водной суспензии магносорбента. При соблюдении указанных условий иммобилизации МС показал способность связывать более 10 мг туляремийных IgG на 1,0 г сорбента.

Результаты исследований стабильности основных показателей качества СО МС представлены в табл. 2, 3.

Установлено, что образцы СО МС при температурах хранения $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ и $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$ бы-

ли стабильны без изменения внешнего вида, pH и адсорбционной активности в течение 48 месяцев (срок наблюдения).

По результатам, полученным в процессе «ускоренного старения», было установлено, что более высокая температура хранения образцов $(58 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 14 и 21 сут. не влияла на показатели pH и адсорбционной активности. Однако наблюдалось изменение цветности надосадочной жидкости в образцах после 21 сут. хранения при указанной температуре, не оказывающее существенного влияния на основные аттестуемые характеристики испытуемых серий СО МС.

Предложенные иммобилизованные МС были использованы в модифицированном методе иммуноферментного анализа, чувствительность и специфичность определяли с использованием коммерческого набора реагентов тест-системы иммуноферментной магноиммуносорбентной для выявления возбудителя туляремии «ИФА-МИС-Тул-СтавНИПЧИ» и гетерологичных штаммов *Salmonella typhimurium* 9640, *Brucella abortus* 19 BA, *Yersinia enterocolitica* 383, *Escherichia coli* 113-3.

Таблица 2. Критерии стабильности аттестуемых показателей пяти экспериментальных серий стандартного образца магносорбента (СО МС) при хранении в температурном режиме $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ и $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$ (для контроля использовано по три флакона из каждой серии)

Table 2. Criteria of stability of the appraise indicators of the five experimental series of a standard sample of magnosorbent (MS) storage temperature conditions $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ and $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$ (three bottles from each series are used for control)

Периодичность контроля (месяцы)	Контролируемые показатели	Серии контролируемого препарата				
		Серия 1	Серия 2	Серия 3	Серия 4	Серия 5
3	Внешний вид	Водная суспензия при перемешивании образует гомогенную взвесь черного цвета, при отстаивании – прозрачную надосадочную жидкость с черным осадком на дне флакона, легко разбивающимся при встряхивании				
6						
9						
12						
18	pH	$7,0 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,2$
24	Адсорбционная активность, мг/мл	$1,0 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$
36						
48						

Таблица 3. Критерии стабильности аттестуемых показателей пяти экспериментальных серий стандартного образца магносорбента (СО МС) при хранении в температурном режиме $(58 \pm 1)^\circ\text{C}$ (для контроля использовано по три флакона из каждой серии)

Table 3. Criteria of stability of the appraise indicators of the five experimental series of a standard sample of magnosorbent (MS) when stored in a temperature range $(58 \pm 1)^\circ\text{C}$ (three bottles from each series are used for control)

Срок хранения	Контролируемые показатели	Серии контролируемого препарата									
		1	2	3	4	5					
Через 14 сут. хранения	Внешний вид	Водная суспензия при перемешивании образует гомогенную взвесь черного цвета, при отстаивании – прозрачную надосадочную жидкость с черным осадком на дне флакона, легко разбивающимся при встряхивании									
	pH						$7,0 \pm 0,2$				
	Адсорбционная активность, мг/мл						$1,0 \pm 0,2$				
Через 21 сут. хранения	Внешний вид	Водная суспензия при перемешивании образует гомогенную взвесь черного цвета, при отстаивании – светло-желтую прозрачную надосадочную жидкость с черным осадком на дне флакона, легко разбивающимся при встряхивании									
	pH						$7,0 \pm 0,2$				
	Адсорбционная активность, мг/мл						$1,0 \pm 0,2$				

При контроле чувствительности в иммуноферментном анализе (ИФА) с применением иммобилизованных МС был обнаружен возбудитель туляремии в концентрации $1,0 \times 10^3$ м.к./мл, что соответствует техническим условиям и паспортным данным используемой тест-системы.

При определении специфичности в ИФА не отмечалось перекрестных реакций с гетерологичными микроорганизмами.

Результаты влияния высокой температуры хранения (58 ± 1) °С на свойства СО МС в течение 14 сут. и 21 сут. свидетельствуют о стабильности его специфической активности в ИФА.

Выводы. Исследования критериев стабильности свидетельствуют о верификации срока годности и стабильности показателей качества СО МС нормативной документации, как при воздействии на него высоких температур, так и при хранении в течение 48 месяцев (срок наблюдения).

По совокупности полученных результатов установлено, что СО МС соответствует гарантийному сроку хранения – 3 года.

Проведенные испытания показали, что все экспериментальные серии СО МС соответствуют требованиям (аттестованным значениям) на стандартный образец предприятия, что позволило зарегистрировать его в реестре стандартных образцов ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора (регистрационный номер 007-9388-2015).

Разработанный и аттестованный стандартный образец магносорбента ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора позволяет получать точные и сопоставимые результаты при производстве магноиммуносорбентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаркуша Ю.Ю., Старцева О.Л., Жарникова И.В. и др. Стандартные условия биотехнологии производства магноиммуносорбентов, используемые в лабораторной диагностике // Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе: материалы научно-практической конференции. Новосибирск, 26–27 сентября 2016 г. С. 145–146.
2. Жарникова И.В. Магноиммуносорбенты и изучение их стабильности в зависимости от сроков хранения // Проблемы особо опасных инфекций. 2003. Вып. 85. С. 171–175.
3. Капустин Д.В., Zubov V.P. Синтез многоцелевых фторполимер- и полианилинсодержащих нанокмозитов и их применение в биосепарации, биоанализе и диагностике // Вестник МИХТХ. 2011. Т. 6. № 5. С. 21–46.
4. Сроки годности лекарственных средств: ОФС.1.1.0009.15 (общая фармакопейная статья) // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т. I. С. 192–206: [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1_html/HTML/#192 (дата обращения: 17.07.2018).
5. Старцева О.Л., Курчева С.А., Гаркуша Ю.Ю. и др. К вопросу разработки стандартного образца композиционного органокремнеземного микрогранулированного магносорбента // Инновационные технологии в противозидемической защите населения: материалы Всероссийской научно-практической конференции, 28 мая 2014 г. / Под ред. д.м.н., проф. Е.И. Ефимова. Н. Новгород: Алтай, 2014. С. 239–241.
6. Старцева О.Л., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н. и др. Оптимизация параметров стадии механического измельчения при конструировании стандартного образца магносорбента // VII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнад-

зора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены», Санкт-Петербург, 08–10 декабря 2015 г. С. 192–193.

7. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Старцева О.Л. и др. Разработка стандартных условий биотехнологии производства иммуномагнитного сорбента для экспресс-диагностики опасных инфекционных заболеваний // Технологии живых систем. 2017. № 2. С. 52–57.
8. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Савельева И.В. и др. Разработка тест-систем магноиммуносорбентных для выявления холерного вибриона в объектах окружающей среды // Здоровье населения и среда обитания. 2014. № 4 (253). С. 17–19.

REFERENCES

1. Garkusha Yu.Yu., Startseva O.L., Zhamnikova I.V. et al. Standartnye uslovia biotekhnologii proizvodstva magnoimmunosorbentov, ispol'zuemye v laboratornoj diagnostike [Standard conditions of biotechnology of production of magnoimmunosorbents used in laboratory diagnostics]. Diagnostika i profilaktika infektsionnykh boleznej na sovremennom etape: materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Novosibirsk, 26–27 September 2016, pp. 145–146. (In Russ.)
2. Zhamnikova I.V. Magnoimmunosorbenty i izuchenie ikh stabil'nosti v zavisimosti ot srokov khraneniya [Magnoimmunosorbents and the study of their stability depending on the shelf life]. Problemy osobo opasnykh infektsij, 2003, issue 85, pp. 171–175. (In Russ.)
3. Kapustin D.V., Zubov V.P. Sintez mnogotsel'nykh ftorpolimer- i polianilinsoderzhashchikh nanokompozitov i ikh primenenie v bioseparacii, bioanalize i diagnostike [Synthesis of multi-purpose fluoropolymer- and polyaniline-containing nanocomposites and their application in bioseparation, bioanalysis and diagnostics]. Vestnik MIHTH, 2011, vol. 6, no. 5, pp. 21–46. (In Russ.)
4. Sroki godnosti lekarstvennykh sredstv: OFS.1.1.0009.15 (obshchaja farmakopejnaja stat'ja) [Shelf life of medicines: OFS.1.1.0009.15 (General Pharmacopoeia)]. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federatsii, XIII edition, vol. I, pp. 192–206: Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1_html/HTML/#192 (accessed 17.07.2018). (In Russ.)
5. Startseva O.L., Kurcheva S.A., Garkusha Yu.Yu. et al. K voprosu razrabotki standartnogo obrazca kompozitsionnogo organokremnezemnogo mikrogranulirovannogo magnosorbenta [The issue of development of a standard sample of composite organosilicon microgranulated magnosorbent]. Innovatsionnye tekhnologii v protivoepidemicheskoy zashchite naselenija: materialy Vserossijskoj nauchno-prakticheskoy konferentsii, 28 May 2014. Edited by Doctor of Medical Sciences, Professor E.I. Efimov. Nizhny Novgorod: Altaj Publ., 2014, pp. 239–241. (In Russ.)
6. Startseva O.L., Tjumentseva I.S., Afanas'ev E.N. et al. Optimizatsija parametrov stadii mekhanicheskogo izmel'chenija pri konstruirovanii standartnogo obrazca magnosorbenta [Optimization of parameters of the mechanical grinding stage in the design of a standard sample of magnosorbent]. VII Vserossijskaja nauchno-prakticheskaja konferentsija molodykh uchenykh i spetsialistov Rospotrebnadzora «Sovremennye problemy epidemiologii i gigieny», Saint-Petersburg, 08–10 December 2015, pp. 192–193. (In Russ.)
7. Tjumentseva I.S., Afanas'ev E.N., Startseva O.L. et al. Razrabotka standartnykh uslovij biotekhnologii proizvodstva immunomagnitnogo sorbenta dlja ekspress-diagnostiki opasnykh infektsionnykh zaboлевanij [Development of standard conditions of biotechnology of production of immunomagnetic sorbent for rapid diagnosis of dangerous infectious diseases]. Tekhnologii zhivykh sistem, 2017, no. 2, pp. 52–57. (In Russ.)
8. Tjumentseva I.S., Afanas'ev E.N., Savel'eva I.V. et al. Razrabotka test-sistem magnoimmunosorbentnykh dlja vyjavlenija holernogo vibriona v objektakh okruzhajushchej sredy [Development of test systems magnoimmunosorbents for the detection of Vibrio cholerae in the environment]. Zdorov'e naselenija i sreda obitanija, 2014, no. 4 (253), pp. 17–19. (In Russ.)

Контактная информация:

Курчева Светлана Александровна, кандидат биологических наук, заведующий научно-производственной лабораторией препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
e-mail: kurcheva@yandex.ru

Contact information:

Kurcheva Svetlana, Candidate of Biological Sciences, Head of the science-practical laboratory of preparations for diagnostic of dangerous and other infections, Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
e-mail: kurcheva@yandex.ru

