

ОЦЕНКА ПРИГОДНОСТИ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ ГИДРОЛИЗАТА БЕЛКОВ КРОВИ

М. Н. Гусева¹, М. И. Доронин², М. А. Шевченко³, Д. В. Михалишин⁴, А. А. Шишкова⁵

¹ Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: guseva_mn@arriah.ru

² Научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: doronin@arriah.ru

³ Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: shevchenko_ma@arriah.ru

⁴ Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: michalishin_dv@arriah.ru

⁵ Главный технолог, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: shishkova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В биотехнологии производства противоящурных вакцин важнейшим условием получения полноценного конечного продукта является использование высококачественных питательных сред, к основным компонентам которых, обеспечивающим их питательную ценность, относятся белковые гидролизаты. Большое значение имеет контроль входящего сырья, в частности, оценка качества гидролизата белков крови различных серий. В настоящее время существуют различные методики, позволяющие определять эффективность гидролизатов с применением в качестве тест-систем культур клеток и одноклеточных организмов. В представленной работе в качестве модели для оценки биологической активности и токсичности гидролизата белков крови в сырье для производства противоящурных вакцин использовали суспензионную клеточную линию из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21). Для подтверждения достоверности полученных результатов исследования проведена процедура валидации предложенной методики. При исследовании 560 проб гидролизата белков крови определены основные валидационные характеристики методики: правильность, специфичность, чувствительность, а также прецизионность в условиях сходимости и воспроизводимости. Результаты валидации предложенной методики имели высокий уровень достоверности (критерий Фишера – 0,021; $\leq 0,050$) и полностью соответствовали критериям приемлемости.

Ключевые слова: гидролизат белков крови, биологическая активность, токсичность, специфичность, чувствительность тест-системы, правильность методики, прецизионность.

UDC 619:578.835.2:57.082.26:612.124

EVALUATION OF SUITABILITY OF METHODS FOR TESTING BLOOD PROTEIN HYDROLYSATES FOR THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY AND TOXICITY

M. N. Guseva¹, M. I. Doronin², M. A. Shevchenko³, D. V. Mikhailishin⁴, A. A. Shishkova⁵

¹ Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russian Federation, e-mail: guseva_mn@arriah.ru

² Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russian Federation, e-mail: doronin@arriah.ru

³ Leading Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russian Federation, e-mail: shevchenko_ma@arriah.ru

⁴ Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russian Federation, e-mail: michalishin_dv@arriah.ru

⁵ Chief Technologist, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russian Federation, e-mail: shishkova@arriah.ru

SUMMARY

The use of high quality nutrient media comprising protein hydrolysates as the main components for maintaining their nutrient value is a critical prerequisite for appropriate final product preparation in FMD vaccine biotechnology. The incoming control of raw materials, in particular testing blood protein hydrolysates of different batches for their quality, is of considerable importance. Currently, there are different methods for the determination of hydrolysate efficacy using cell cultures and unicellular organisms as test systems. We used suspended baby hamster kidney (BHK-21) cell line as a model for testing blood protein hydrolysates in the raw materials intended for FMD vaccine production for their biological activity and toxicity. The validation of the proposed method was carried out to confirm the reliability of the test results obtained. The following main validation characteristics were determined through testing 560 blood protein hydrolysate samples: trueness, specificity, sensitivity, as well as precision under repeatability and reproducibility conditions. The validation results for the proposed method demonstrated high reliability (Fisher's criterion – 0.021; ≤ 0.050) and full compliance with acceptance criteria.

Key words: blood protein hydrolysate, biological activity, toxicity, specificity, test-system sensitivity, trueness of methods, precision.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в клеточной биотехнологии четко определено и интенсивно развивается направление, связанное с созданием питательных сред, содержащих гидролизаты белкового сырья в качестве ростовой аминокислотной и пептидной составляющей [3, 7, 9].

Малейшие отклонения от технологического процесса могут привести к появлению токсичности гидролизата белков крови (ГБК), снижению ростовых свойств питательных сред, в составе которых используется ГБК, вплоть до гибели клеток [7, 11]. Поэтому в биотехнологическом производстве важен контроль входящего сырья, в частности, оценка качества ГБК различных серий.

На сегодняшний день существуют различные методики, позволяющие определять эффективность гидролизатов с применением в качестве тест-систем культур клеток и одноклеточных организмов [10]. Однако, в результате анализа научных публикаций, сведений о применении суспензионной клеточной линии из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21) в качестве модели для оценки биологической активности и токсичности ГБК обнаружено не было.

В системе контроля входящего сырья необходимы гарантии достоверности результатов анализа. Для этого предусмотрена процедура валидации аналитических методов, которая является одним из элементов контроля всего процесса производства лекарств [13].

Валидация – это процесс подтверждения качественного выполнения всех требований, предъявляемых для конкретного применения, на основании представления объективных доказательств (ISO 9000:2005) [5]. Процесс валидации предполагает определение объективных параметров тест-системы, к которым относятся правильность, сходимость, воспроизводимость при разных условиях проведения теста, специфичность и чувствительность [1, 2, 12, 13].

Обеспечение достоверности полученных результатов исследования возможно исключительно при использовании точной методики. В метрологии точность – это близость результата измерений к эталонному значению величины [4]. Для полного раскрытия понятия точности количественной методики используют термины «правильность» и «прецизионность». Под правильностью понимают степень близости экспериментальных результатов к истинному значению во всей области измерений. Главным фактором, определяющим правильность, является значение систематической погрешности. Прецизионностью является близость между независимыми результатами, полученными при определенных принятых условиях постановки эксперимента. Внутрिलाбораторная (промежуточная) прецизионность валидируемой методики оценивается в условиях работы одной лаборатории (разные дни, разные исполнители, разное оборудование и т. д.). Для оценки степени достижения необходимого качества результатов проводят анализ повторяемости в условиях сходимости и воспроизводимости, определяя абсолютные и относительные показатели вариации [1, 8, 13].

Целью исследования была оценка пригодности методики определения биологической активности и наличия/отсутствия токсичности гидролизата белков крови разных серий для проведения анализа сырья при изготовлении противоящурных вакцин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная линия. В работе использовали суспензионную клеточную линию из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21) 1-го и 2-го пассажей с концентрацией не ниже $3,0 \times 10^6$ кл./мл.

Среда для культивирования клеток. Для выращивания клеток линии ВНК-21 применяли культуральную среду на основе раствора Хэнкса, содержащую необходимый для роста клеток набор солей, аминокислот и витаминов, дополненную 5% сыворотки плодов коров фирмы SERANA, инактивированной при температуре 56°C в течение 30 мин, а также исследуемый ГБК. Стерилизацию ГБК проводили паровоздушным методом автоклавирования при температуре $132 \pm 2^\circ\text{C}$ и давлении 0,2 МПа в течение 1 ч.

Определение биологической активности ГБК. Выращивание клеток линии ВНК-21 осуществляли в культуральных флаконах с приготовленным раствором питательной среды и посевной концентрацией клеток $0,4\text{--}0,7 \times 10^6$ кл./мл. Для оценки биологической активности ГБК тестировали в двух концентрациях: 0,25 и 0,50% по сухому веществу. Инкубацию клеток осуществляли в стеклянных культиваторах, помещенных в термостатируемый шейкер Incubation Schüttelschrank BS 4 со скоростью перемешивания суспензии 150 ± 5 об/мин и при температуре $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Показатель кислотности клеточной суспензии поддерживали на уровне 7,0–7,2 с использованием стерильного 7,5%-го раствора гидрокарбоната натрия. Пересев клеток проводили каждые 48 ч в течение 5 последовательных пассажей.

Определение кратности прироста клеток. Концентрацию клеток ВНК-21 в суспензии определяли с помощью камеры Горяева для счета форменных элементов крови. Количество клеток в 1 мл суспензии рассчитывали по формуле [11]:

$$X = \frac{A \times B \times 4000}{3600} \times 1000,$$

где X – количество клеток в 1 мл;

A – общее количество клеток в камере;

B – разведение суспензии.

Увеличение концентрации клеток оценивали по кратности прироста (КП), пользуясь формулой:

$$\text{КП} = \frac{a}{b},$$

где a – концентрация клеток через 48 ч после посева;

b – посевная концентрация клеток.

Интерпретация результата исследования биологической активности и токсичности ГБК. Оценка качества ГБК по среднему значению КП проводилась следующим образом:

- если среднее значение КП ($\text{КП}_{\text{ср}}$) за 5 пассажей составляло 4,5–5,0, то ГБК считали биологически активным;
- если $\text{КП}_{\text{ср}}$ находилось в диапазоне от 3,0 до 4,5, то гидролизат оценивали как удовлетворительный;
- если $\text{КП}_{\text{ср}}$ ниже 3,0, то ГБК выбраковывали.

Токсичность ГБК оценивали следующим образом: если на протяжении 5 последовательных пассажей клетки линии ВНК-21 оставались живыми (в 4-м и 5-м пассажах допускалось не менее 60%), то такой ГБК считался нетоксичным. В противном случае гидролизат выбраковывали.

Такая интерпретация результатов была принята, поскольку определение биологической активности и токсичности ГБК проводилось при выращивании клеток без внешнего поступления 5% углекислого газа. В таких условиях к 4–5-му пассажу их жизнеспособность резко снижалась.

Оценка правильности методики. Для оценки правильности методики осуществляли исследование ГБК в концентрациях 0,25 и 0,50%, а также образца только с 5% прогретой сыворотки плодов коров в 3 повторностях. Для характеристики набора полученных данных применяли понятие «персентиль», которое определяет ранги элементов выборки в виде процентов таким образом, что наименьшему значению элемента данных соответствует персентиль, равный 0%, наибольшему – 100%, медиане – 50% и т. д. Промежуточные значения имеют персентили, расположенные с шагом $100/(n - 1)$. Для проведения сравнительного анализа дисперсий 2 вариационных рядов (с 0,25 и 0,50% ГБК) проводили расчет критерия Фишера (F) [4].

Оценка специфичности методики. Под специфичностью понимают возможность методики определять пробы в качестве отрицательных относительно всех исследуемых заведомо отрицательных образцов. В данной работе отрицательными (подвергшимися выбраковыванию) считали ГБК, которые проявляли токсичность для суспензионной перевиваемой клеточной линии ВНК-21 и индуцировали кратность прироста менее 3,0. Анализ данных образцов проводили в 3 повторностях, по итогам которых определяли среднее значение кратности прироста клеток и доказывали, что исследуемые серии ГБК являлись не подходящими для производственных целей.

Оценка чувствительности методики. Для оценки чувствительности осуществляли исследование заведомо положительных проб и определяли значение кратности прироста суспензионной культуры клеток ВНК-21.

Оценка промежуточной прецизионности в условиях воспроизводимости и сходимости. Для оценки прецизионности количественной методики определения биологической активности ГБК осуществляли исследование в одних и тех же условиях измерения (оборудование, лаборатория, временной промежуток – 10 сут, один оператор), кроме фактора отличия суспензии клеток (разные пассажы). Анализ также проводили в одних и тех же условиях измерения (оборудование, клеточная суспензия, лаборатория, кроме фактора субъективности (тест выполнен двумя операторами) и временного промежутка (в течение 24 сут). Исследо-

вания проводили в 3 повторностях. Для оценки прецизионности количественной методики в условиях сходимости и воспроизводимости рассчитывали абсолютные и относительные показатели вариации.

Определение абсолютных показателей вариации. Размах вариации (R) рассчитывали как разность между наибольшим и наименьшим значениями порогового цикла амплификации: $R = Ct_{\max} - Ct_{\min}$. Индивидуальное линейное отклонение (d_i) находили по формуле: $d_i = |Ct_i - Ct_{cp}|$. Среднее линейное отклонение (d_{cp}) рассчитывали как среднее арифметическое из индивидуальных линейных отклонений по формуле:

$$d_{cp} = \sum |d_i| / N,$$

где d_i – индивидуальные линейные отклонения;
N – объем совокупности.

Оценку дисперсии (δ^2) показателей проводили с использованием формулы: $\delta^2 = (\sum d_i^2) / N$. Для характеристики размеров вариации рассчитывали среднее квадратичное отклонение (δ), пользуясь формулой: $\delta = \sqrt{(\delta^2)}$ [1, 8].

Определение относительных показателей вариации. Относительное стандартное отклонение (RSD) находили по формуле: $RSD = \delta / Ct_{cp}$. Расчет коэффициента осцилляции (V_R) проводили, пользуясь формулой: $V_R = (R / Ct_{cp}) \times 100$. Линейный коэффициент вариации (C_d) рассчитывали по формуле: $C_d = (d_{cp} / Ct_{cp}) \times 100$. Для оценки колеблемости индивидуальных значений пороговых циклов амплификации определяли коэффициент вариации (C_δ) по формуле: $C_\delta = (\delta / Ct_{cp}) \times 100$ [1, 8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы оценивали правильность методики определения биологической активности ГБК. Главным фактором, определяющим этот параметр, является систематическая погрешность при сравнении с результатами ранее предложенного метода. Однако по итогам анализа научных данных методики, которые применяли для исследования именно биологической активности ГБК, найдены не были. Поэтому для проведения сравнительного анализа осуществляли культивирование клеток линии ВНК-21 в ростовой среде, содержащей 5% прогретой сыворотки плодов коров, и в такой же среде, но с добавлением ГБК. Результаты тестирования контрольных образцов ГБК в течение 5 последовательных пассажей в 3 повторениях отражены в таблице 1 и на рисунке.

Из данных таблицы 1 видно, что кратность прироста при использовании ГБК в концентрациях 0,25 и 0,50%

Таблица 1
Оценка правильности методики определения биологической активности гидролизата белков крови

№ п/п	Характеристика образца		Кратность прироста в течение 5 пассажей/процент живых клеток				
			ожидаемый результат	полученный результат			$M \pm m$
				1-е повторение	2-е повторение	3-е повторение	
1	ГБК 0,25% (серия 6)	сыворотка плодов коров 5%	≥4,5/98–100	5,8/98	4,9/98	5,5/98	5,2 ± 0,3
2	ГБК 0,50% (серия 6)	сыворотка плодов коров 5%	≥4,5/98–100	5,2/99	4,4/99	6,3/98	5,3 ± 0,9
3	сыворотка плодов коров 5%		<3,0/98–100	1,9/99	2,0/98	2,2/99	2,0 ± 0,1

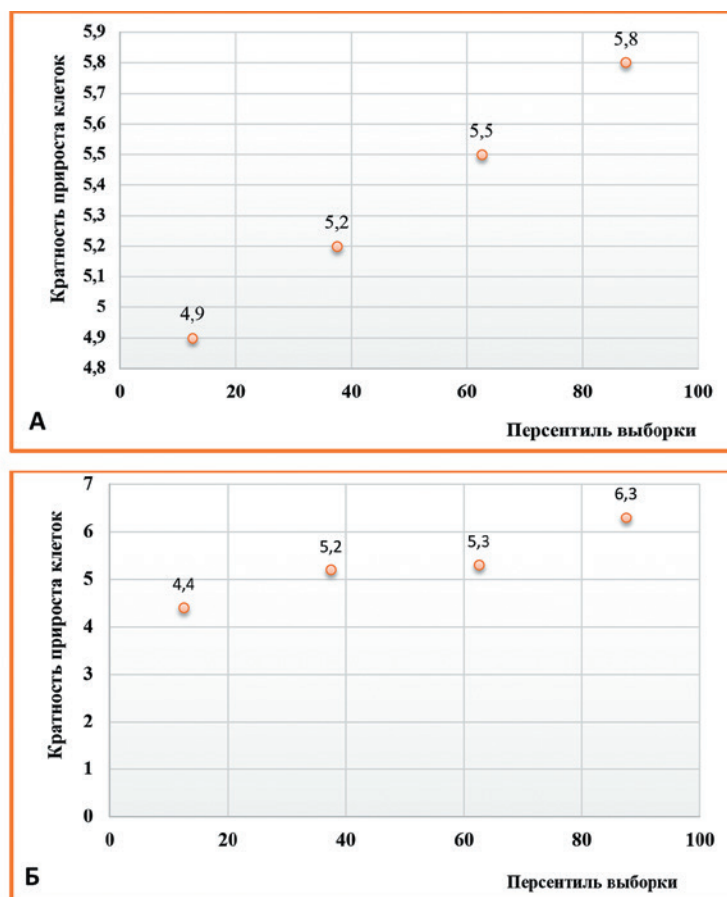


Рис. Оценка правильности валидируемой методики при анализе биологически активных образцов с содержанием ГБК в концентрации 0,25% (А) и 0,50% (Б)

составляла 5,2–5,3. При использовании только сыворотки плодов коров популяция клеток уменьшалась более чем в 2 раза.

Результаты исследования продемонстрированы на рисунке в виде уравнений $y_x = 5,989 + 0,3158x$ (А), $y_x = -3,653 - 4,421x$ (Б) и доказывают, что при использовании ГБК в концентрациях 0,25 и 0,50% интенсивность прироста клеток линии ВНК-21 удовлетворяла требованию $>3,0$ в соответствии с разработанной методикой [11].

При исследовании 560 проб ГБК в концентрациях 0,25 и 0,50%, проведенном с применением разработанной методики, получили данные, статистический анализ которых позволил сделать вывод о том, что при содержании ГБК в концентрации 0,25% критерий Фишера (F) соответствовал 0,021, что значительно меньше 0,05. Иными словами, представленная модель была значима. При увеличении гидролизата до 0,50% рассматриваемый критерий равнялся 2,08, что значительно больше 0,05, следовательно, модель была статистически незначима [4].

Таким образом, из анализа полученных данных следует, что использование валидируемой методики при концентрации ГБК, равной 0,25%, давало свободные от ошибки результаты. При увеличении содержания гидролизата до 0,50% представленная методика может применяться для оценки токсичности препарата путем определения процента живых клеток в суспензии.

На следующем этапе работы определяли специфичность методики исследования биологической активности ГБК при тестировании 14 токсичных проб в суспензионной перевиваемой клеточной линии ВНК-21 в течение 3 последовательных пассажей в 3 повторениях. Результаты анализа представлены в таблице 2.

При концентрации гидролизата, равной 0,25%, кратность прироста снижалась до 1,2–1,8, а доля живых клеток составляла 40–60%. При содержании ГБК в концентрации 0,50% кратность прироста была равна 0,7–1,5, доля живых клеток при этом находилась в диапазоне 25–42%. Таким образом, результаты анализа показали, что в суспензионной клеточной линии ВНК-21 все пробы ГБК проявляли токсичность, что выражалось в гибели клеток (доля живых клеток $<60\%$) и снижении кратности прироста ($КП < 3,0$) [10]. Исходя из того, что все 14 отрицательных проб были определены как токсичные, сделан вывод – специфичность валидируемой методики составляет 100%.

Следующий этап исследования был посвящен оценке чувствительности предложенного метода определения биологической активности ГБК с концентрацией 0,25% при тестировании 546 заведомо качественных проб гидролизата. Результаты анализа представлены в таблице 3.

Из данных, представленных в таблице 3, видно, что 76% исследуемых образцов были определены в качестве биологически активных ($4,5 < КП < 5,0$) и 24% признаны удовлетворительными ($3,0 < КП < 4,5$) для производственных целей. Таким образом, при анализе 546 заведомо качественных образцов ГБК все пробы были определены как пригодные для работы. Это подтверждает, что предложенная тест-система для определения биологической активности ГБК обладает высокой чувствительностью.

На следующем этапе работы проводили оценку прецизионности методики в условиях сходимости, тестируя пробы в 3 повторностях, выполненных в одних и тех же условиях измерения (оборудование, лаборатория, временной промежуток – 10 сут, один оператор), кроме фактора отличия суспензии клеток по номеру пассажа.

Результаты статистического анализа представлены в таблице 4, из которой видно, что при исследовании 2 серий ГБК с концентрацией 0,25% в течение 3 последовательных пассажей среднее линейное отклонение (d_{cp}) составило 0,044–0,067, следовательно, степень колеблемости $КП_i$ во всех выборках относительно среднего уровня признака низкая. Коэффициент вариации (C_v) варьировал от 0,878 до 1,899 ($\leq 2\%$) [1, 8], что подтверждает высокую степень достоверности результатов внутри каждой выборки. При анализе 2 серий ГБК с концентрацией 0,50% в течение 3 последовательных пассажей значение d_{cp} составило 0,044–0,089. Иными словами, степень различий $КП_i$ относительно среднего показателя низкая, при этом значение статистической величины C_v находилось в диапазоне 0,918–1,768 ($\leq 2\%$) [1]. Таким образом, результаты исследования для каждой выборки являются достоверными.

Проводили также анализ прецизионности методики в условиях воспроизводимости. Для этого 2 серии ГБК тестировали в 3 повторениях в одних и тех же условиях измерения (оборудование, клеточная суспензия, лаборатория), кроме фактора субъективности (тест выполнен двумя операторами в разное время) и временного

Таблица 2
Оценка специфичности методики оценки биологической активности и токсичности ГБК

№ п/п	Кратность прироста в течение 3 пассажей/процент живых клеток													
	ожидаемый результат		полученный результат											
			0,25% ГБК						0,50% ГБК					
			1-й пассаж		2-й пассаж		3-й пассаж		1-й пассаж		2-й пассаж		3-й пассаж	
1	<3,0	<60%	1,8 ± 0,1	60	1,7 ± 0,1	55–56	1,4 ± 0,2	42–44	1,5 ± 0,2	42–43	1,3 ± 0,1	40	1,0 ± 0,2	35–38
2			1,5 ± 0,1	58–60	1,5 ± 0,2	52–55	1,2 ± 0,1	45–46	1,3 ± 0,1	42–44	1,3 ± 0,2	40–42	1,1 ± 0,1	29–30
3			1,4 ± 0,1	55–58	1,3 ± 0,2	50–52	1,2 ± 0,3	45–48	1,2 ± 0,2	40	1,1 ± 0,2	40–43	0,8 ± 0,1	30
4			1,5 ± 0,2	58–60	1,3 ± 0,1	51–53	1,3 ± 0,1	40–45	1,4 ± 0,2	41–43	1,2 ± 0,2	38–39	1,0 ± 0,2	35
5			1,6 ± 0,1	59–60	1,5 ± 0,1	50–55	1,3 ± 0,1	42–44	1,5 ± 0,1	35–38	1,3 ± 0,2	31–34	0,9 ± 0,1	28–31
6			1,7 ± 0,1	60	1,5 ± 0,1	49–55	1,2 ± 0,2	40–42	1,5 ± 0,1	39–40	1,4 ± 0,1	33–39	1,0 ± 0,1	25–38
7			1,7 ± 0,2	56–57	1,5 ± 0,1	50–55	1,3 ± 0,1	40–45	1,5 ± 0,1	40	1,3 ± 0,3	35–41	0,9 ± 0,1	26–29
8			1,5 ± 0,1	54–58	1,3 ± 0,2	50–54	1,3 ± 0,1	41–43	1,3 ± 0,1	42–45	1,2 ± 0,1	35–38	0,9 ± 0,2	25–26
9			1,4 ± 0,1	55–60	1,3 ± 0,1	45–51	1,2 ± 0,1	40	1,3 ± 0,1	41	1,2 ± 0,1	35–36	0,8 ± 0,1	25–30
10			1,7 ± 0,1	54–58	1,6 ± 0,1	46–50	1,4 ± 0,2	42–45	1,4 ± 0,1	40–44	1,0 ± 0,1	30–35	0,9 ± 0,1	29–31
11			1,7 ± 0,1	52–55	1,5 ± 0,2	44–48	1,3 ± 0,1	40–44	1,5 ± 0,1	42–44	1,2 ± 0,1	34–39	1,0 ± 0,2	28–30
12			1,6 ± 0,2	50–55	1,5 ± 0,2	45–50	1,2 ± 0,2	40–45	1,3 ± 0,1	36–37	1,1 ± 0,1	30–33	0,8 ± 0,1	29–34
13			1,6 ± 0,2	49–54	1,4 ± 0,2	45–50	1,2 ± 0,1	40–42	1,2 ± 0,2	35–40	1,0 ± 0,2	33–40	0,8 ± 0,1	25–28
14			1,6 ± 0,1	54–60	1,3 ± 0,1	47–48	1,2 ± 0,1	40	1,2 ± 0,1	36–42	1,0 ± 0,2	35–38	0,7 ± 0,1	28–32

промежутка (в течение 24 сут). Результаты исследования продемонстрированы в таблице 5.

По итогам статистического анализа 2 серий ГБК с концентрацией 0,25% в течение 3 последовательных пассажей среднее линейное отклонение составило 0,030–0,060, а с концентрацией 0,50% – 0,027–0,043. Иными словами, степень изменений КП₁ в представленных совокупностях низкая. Коэффициент вариации (C_v) при оценке ГБК с концентрацией 0,25% варьировал от 1,185 до 2,234, ГБК с содержанием в концентрации 0,50% – от 1,375 до 1,913 (≤3%) [1, 8], что подтверждало незначительную степень отклонений от среднего арифметического и высокую степень достоверности результатов внутри каждой выборки.

Проведя сравнительный анализ данных, полученных при оценке прецизионности методики, выявили, что в условиях сходимости степени достоверности результатов определения биологической активности ГБК выше по сравнению с оценкой, проводимой в условиях

воспроизводимости, что соответствовало общепринятым ожиданиям в статистике [1]. При этом по всем абсолютным и относительным показателям вариации методика удовлетворяла критериям приемлемости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена оценка основных валидационных характеристик методики определения биологической активности и наличия/отсутствия токсичности гидролизата белков крови для применения в анализе сырья при изготовлении противоящурных вакцин.

При использовании ГБК, не проявляющих токсичность, в концентрациях 0,25 и 0,50% интенсивность прироста клеток линии ВНК-21 составляла >3,0, что соответствовало требованиям разработанной методики. При исследовании 560 проб ГБК в концентрациях 0,25 и 0,50% с применением разработанной методики выявили, что при использовании гидролизата с содержанием 0,25% уровень значимости критерия Фишера со-

Таблица 3
Оценка чувствительности тест-системы для определения биологической активности ГБК (546 проб, n = 3)

Кратность прироста			Доля живых клеток в суспензии, %					
ожидаемый результат	фактический результат		ожидаемый результат		фактический результат			
	3,0–4,5	4,5–5,0			95–100	90–95	60–90	<60
>3,0	131	415	1–3-й пассажи	98–100	302	125	119	0
			4–5-й пассажи	>60	235	177	134	0

Таблица 4
Оценка прецизионности методики определения биологической активности ГБК в условиях сходимости при исследовании в 3 пассажах ($n = 3$)

№ п/п	Характеристика исследуемого образца	Статистические показатели								
		Наибольшее значение ($K_{\text{пр max}}$)	Наименьшее значение ($K_{\text{пр min}}$)	Размах вариации (R)	Среднее линейное отклонение ($d_{\text{л}}$)	Дисперсия (δ^2)	Среднее квадратичное отклонение (δ)	Коэффициент осцилляции ($V_{\text{р}}$), %	Линейный коэффициент вариации ($C_{\text{л}}$)	Коэффициент вариации ($C_{\text{р}}$), %
1	ГБК серия № 6, концентрация 0,25%									
	1-й пассаж	5,1	5,0	0,1	0,044	0,002	0,047	1,974	0,877	0,930
	2-й пассаж	5,4	5,3	0,1	0,044	0,002	0,047	1,863	0,828	0,878
	3-й пассаж	5,1	5,0	0,1	0,044	0,002	0,047	1,987	0,883	0,937
2	ГБК серия № 6, концентрация 0,50%									
	1-й пассаж	5,2	5,1	0,1	0,044	0,002	0,047	1,948	0,866	0,918
	2-й пассаж	5,4	5,2	0,2	0,089	0,009	0,094	3,750	1,667	1,768
	3-й пассаж	4,9	4,8	0,1	0,044	0,003	0,047	2,055	0,913	0,969
3	ГБК серия № 53, концентрация 0,25%									
	1-й пассаж	4,1	4,0	0,1	0,044	0,002	0,047	2,459	1,093	1,159
	2-й пассаж	4,4	4,3	0,1	0,044	0,002	0,047	2,308	1,026	1,088
	3-й пассаж	4,4	4,2	0,2	0,067	0,007	0,082	4,651	1,550	1,899
4	ГБК серия № 53, концентрация 0,50%									
	1-й пассаж	4,2	4,1	0,1	0,044	0,002	0,047	2,400	1,067	1,131
	2-й пассаж	4,4	4,3	0,1	0,044	0,002	0,047	2,290	1,018	1,080
	3-й пассаж	4,3	4,2	0,1	0,044	0,002	0,047	2,362	1,050	1,114

ставлял 0,021 ($<0,05$). Иными словами, представленная модель была значима и подтверждает правильность валидируемой методики. При увеличении количества гидролизата до 0,50% представленный тест может применяться для оценки токсичности препарата путем определения процента живых клеток в суспензии.

При исследовании 546 биологически активных и удовлетворительных, а также 14 токсичных проб ГБК, проведенном с помощью валидируемой методики, подтвердили высокую чувствительность и специфичность представленной тест-системы.

При анализе прецизионности в условиях сходимости и воспроизводимости выявили, что полученные значения исследуемых вариационных показателей соответствуют статистическим ожиданиям относительно правильности методики и удовлетворяют критериям приемлемости.

Предложенная методика является достоверной и может быть использована для определения биологической активности и оценки токсичности ГБК при тестировании сырья для изготовления противоящурных вакцин.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ГОСТ Р ИСО 5725-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 1–6. – Введ. 01.11.02. – М.: Стандартинформ, 2006.
- Государственная фармакопея РФ. Ч. 1. – 12-е изд. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского назначения, 2008. – С. 254–266.
- Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / под ред. Л. П. Дьяконова. – М.: Компания Спутник+, 2009. – 656 с.
- Лакин Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для биол. спец. вузов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
- Международный стандарт ИСО 9000:2005. Системы менеджмента качества – Основные положения и словарь. – 3-е изд. – 2005. – URL: http://www.istu.edu/docs/education/fgos_14/ISO_9000-2005rus.pdf (дата обращения 15.01.19).
- Методические рекомендации по определению биологической активности гидролизата белков крови: утв. ФГБУ «ВНИИЗЖ» 31.08.2018 / М. А. Шевченко, Д. В. Михалишин, М. Н. Гусева; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2018. – 30 с.
- Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера. Т. 2. Биоэнергетика и метаболизм. – М.: Бином, 2011. – 694 с.
- Практикум по GMP. Валидация аналитических методик: теория / П. Носырев, М. Носырева, Т. Рассказова, Н. Корнеева. – URL: <http://www.nedug.ru/news/фармацевтика/2004/2/12/Практикум-по-GMP--Валидация-аналитических-методик-теория> (дата обращения: 12.11.18).
- СТО 63462173-0002-2010. Гидролизат белков крови ферментативный. Технические условия. – Владимир, 2010.
- Телишевская Л. Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение / под ред. А. Н. Панина. – М.: Аграрная наука, 2000. – 295 с.

Таблица 5

Оценка прецизионности методики определения биологической активности ГБК в условиях воспроизводимости при исследовании разными операторами ($n = 3$)

№ п/п	Характеристика исследуемого образца	Статистические показатели								
		Наибольшее значение (K_{max})	Наименьшее значение (K_{min})	Размах вариации (R)	Среднее линейное отклонение (d_{cp})	Дисперсия (δ^2)	Среднее квадратичное отклонение (δ)	Коэффициент осцилляции (V_{p}), %	Линейный коэффициент вариации (C_v)	Коэффициент вариации (C_p), %
1	ГБК серия № 6, концентрация 0,25%									
	1-й пассаж	6,0	5,5	0,5	0,037	0,007	0,086	8,646	0,634	1,489
	2-й пассаж	6,0	5,5	0,4	0,030	0,005	0,071	6,897	0,517	1,219
	3-й пассаж	6,0	5,5	0,4	0,030	0,005	0,068	6,936	0,520	1,185
2	ГБК серия № 6, концентрация 0,50%									
	1-й пассаж	4,7	5,1	0,4	0,035	0,005	0,074	8,136	0,712	1,497
	2-й пассаж	4,7	5,0	0,4	0,027	0,005	0,068	8,054	0,537	1,375
	3-й пассаж	4,6	5,0	0,5	0,043	0,009	0,093	10,247	0,890	1,913
3	ГБК серия № 53, концентрация 0,25%									
	1-й пассаж	4,9	4,9	0,3	0,030	0,004	0,061	6,338	0,634	1,279
	2-й пассаж	4,5	5,0	0,5	0,060	0,011	0,107	10,453	1,150	2,234
	3-й пассаж	4,6	5,0	0,4	0,040	0,008	0,089	8,333	0,833	1,863
4	ГБК серия № 53, концентрация 0,50%									
	1-й пассаж	4,4	4,7	0,3	0,033	0,004	0,066	6,498	0,722	1,440
	2-й пассаж	4,3	4,7	0,4	0,040	0,007	0,082	8,824	0,882	1,801
	3-й пассаж	4,5	4,8	0,3	0,027	0,003	0,058	6,498	0,578	1,266

11. Фреши Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 691 с.

12. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases / OIE. Terrestrial Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). – Chapter 1.1.1. – URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf.

13. Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases / OIE. – 2nd ed. – Paris: OIE, 2008. – 70 p.

REFERENCES

- GOST R ISO 5725-2002. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results [Tochnost' (pravil'nost' i precizionnost') metodov i rezul'tatov izmerenij]. Parts 1–6. Introduced on 01.11.02. M.: Standartinform, 2006 (in Russian).
- The State Pharmacopoeia of the Russian Federation [Gosudarstvennaya farmakopeya RF]. Part 1. 12th ed. M.: Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 2008: 254–266 (in Russian).
- Animal cell in culture (methods and use in biotechnology) [Zhivotnaya kletka v kul'ture (metody i primeneniye v biotekhnologii)]. ed. by L. P. Diakonov. M.: Kompaniya Sputnik+, 2009 (in Russian).
- Lakin G. F. Biometrics: a textbook for biological higher education institutions [Biometriya: uchebnoye posobie dlya biol. spec. vuzov]. 4th ed., revised and updated. M.: Vysshaya shkola, 1990 (in Russian).
- International standard ISO 9000:2005. Quality management systems – Fundamentals and vocabulary. 3rd ed. 2005. URL: http://www.istu.edu/docs/education/fgos_14/ISO_9000-2005rus.pdf (access date 15.01.19).
- Methodological recommendations for the determination of the biological activity of blood protein hydrolysates [Metodicheskie rekomendatsii po opredeleniyu biologicheskoy aktivnosti gidrolizata belkov krovi]: approved by FGBI "ARRIAH" on 31.08.2018. M. A. Shevchenko, D. V. Mikhailishin, M. N. Guseva; FGBI "ARRIAH". Vladimir, 2018 (in Russian).

7. Nelson D., Cox M. Lehninger Principles of Biochemistry. Vol. 2. Bioenergetics and metabolism [Osnovy biohimii Lenindzhera. T. 2. Bioenergetika i metabolism]. M.: Binom, 2011 (in Russian).

8. GMP practicum. Validation of analytical methods: theory [Praktikum po GMP. Validatsiya analiticheskikh metodik: teoriya]. P. Nosyrev, M. Nosyreva, T. Rasskazova, N. Korneyeva. URL: <http://www.nedug.ru/news/farmaceutika/2004/2/12/Практикум-по-GMP--Валидация-аналитических-методик--теория> (access date: 12.11.18) (in Russian).

9. STO 63462173-0002-2010. Fermentative blood protein hydrolysate. Technical specification [Gidrolizat belkov krovi fermentativnyj. Tekhnicheskie usloviya]. Vladimir, 2010 (in Russian).

10. Telishevskaya L. Ya. Protein hydrolysates. Preparation, composition, uses [Belkovyye gidrolizaty. Poluchenie, sostav, primeneniye]. ed. by A. N. Pannin. M.: Agrarnaya nauka, 2000 (in Russian).

11. Freshney R. Ya. Culture of animal cells. A practical guide [Kul'tura zhivotnykh kletok. Prakticheskoe rukovodstvo]. M.: BINOM. Laboratoriya znaniy, 2011 (in Russian).

12. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. OIE. Terrestrial Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). Chapter 1.1.1. URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf.

13. Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases. OIE. 2nd ed. Paris: OIE, 2008.

Поступила 31.01.19

Принята в печать 20.02.19