

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства»

На правах рукописи

Кормщикова Елена Сергеевна

**РАЗРАБОТКА ФАРМАКОПЕЙНОГО СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА
ПРОТИВ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА**

1.5.6 – Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:
доктор медицинских наук И.В. Парамонов

Киров – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	11
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита, его характеристика и роль в экстренной профилактике и терапии инфекции	11
1.2 Методы определения содержания антител к вирусу клещевого энцефалита	18
1.3 Направления совершенствования методик определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита	25
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	31
2.1 Объекты исследования	31
2.2 Методы исследования	32
2.2.1 Методы получения кандидатов в фармакопейный стандартный образец	32
2.2.2 Методы исследования свойств фармакопейного стандартного образца	33
2.2.3 Методы обработки результатов исследования	36
ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ФАРМАКОПЕЙНОГО СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА	42
3.1 Обоснование способа получения фармакопейного стандартного образца	42
3.2 Выбор стабилизатора фармакопейного стандартного образца	44
3.3 Получение и изучение свойств экспериментальных серий фармакопейного стандартного образца	49
ГЛАВА 4 АТТЕСТАЦИЯ ФАРМАКОПЕЙНОГО СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА	55
4.1 Определение аттестуемой характеристики фармакопейного стандартного образца в реакции торможения гемагглютинации	55

4.2	Определение аттестуемой характеристики фармакопейного стандартного образца в иммуноферментном анализе	57
4.3	Анализ стабильности фармакопейного стандартного образца и установление срока годности	65
ГЛАВА 5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФАРМАКОПЕЙНОГО СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА		69
5.1	Совершенствование методики определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита на основе реакции торможения гемагглютинации	69
5.2	Разработка методики определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита на основе иммуноферментного анализа	73
5.3	Изучение специфической активности коммерческих серий иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита с использованием фармакопейного стандартного образца	89
5.4	Экономическое обоснование определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита с использованием фармакопейного стандартного образца	93
ГЛАВА 6 РАЗРАБОТКА НОРМАТИВНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ НА ФАРМАКОПЕЙНЫЙ СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ		95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		101
ВЫВОДЫ		104
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ		105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		107
ПРИЛОЖЕНИЕ А Инструкция по изготовлению, контролю и аттестации фармакопейного стандартного образца содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита (титульный лист)		126
ПРИЛОЖЕНИЕ Б Проект паспорта на фармакопейный стандартный образец содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита		127
ПРИЛОЖЕНИЕ В Проект инструкции по применению фармакопейного стандартного образца содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита		129
ПРИЛОЖЕНИЕ Г		133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Клещевой энцефалит (КЭ) является природно-очаговым вирусным заболеванием, которое может вызывать тяжелые поражения центральной нервной системы, приводящие к инвалидности и летальным исходам. Помимо Российской Федерации (РФ) КЭ эндемичен на территории 27 европейских и 4 азиатских стран [Ruzek D. et al., 2019; Андаев Е.И. и др., 2021].

Для экстренной профилактики и этиотропной терапии этого инфекционного заболевания применяют иммуноглобулин человека против КЭ [Олефир Ю.В. и др., 2015]. Введение препарата в ранние сроки после заражения нейтрализует вирус и формирует пассивный иммунитет к инфекции. Указанные эффекты обусловлены содержанием в препарате специфических антител IgG к вирусу КЭ, выделенных из плазмы крови доноров-реконвалесцентов и/или доноров, иммунизированных соответствующими вакцинами.

В настоящее время на фармацевтическом рынке отсутствует иммуноглобулин человека против КЭ зарубежного производства, выпускается только отечественный препарат, специфическую активность которого определяют согласно нормативной документации в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Метод достаточно трудоемкий, длительный и неудобный для тестирования большого количества образцов. Для выполнения исследования требуются эритроциты гуся, которые не выпускаются в виде готового стандартного реагента. Применение лабильных биологически активных компонентов, субъективность визуальной оценки титра антител могут являться причинами снижения достоверности результатов РТГА.

В лабораторной диагностике КЭ и оценке поствакцинального иммунитета применяют иммуноферментный анализ (ИФА), который относится к инструментальным методам исследования. Продолжительность постановки составляет от 2,5 до 3,5 часов. Для выполнения анализа известен широкий спектр наборов реагентов отечественного и зарубежного производства, однако они не

верифицированы для тестирования препаратов крови и предусматривают разные способы оценки результатов. Отсутствие унифицированной методики ограничивает применение ИФА на биотехнологических производствах для определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ.

Решение задач унификации, повышения достоверности и воспроизводимости результатов контроля качества лекарственных средств неразрывно связано с использованием фармакопейных стандартных образцов (ФСО). Соотнесение результата анализа с общепризнанным стандартом позволяет получать сопоставимые данные при применении разных методик исследования в независимых лабораториях. Обязательное метрологическое обеспечение, неотъемлемой частью которого служит разработка и применение ФСО, установлено на государственном уровне и определяет актуальность исследования [Федеральный закон от 12.04.2010 N 61–ФЗ «Об обращении лекарственных средств»; Приказ Минздрава России от 13.02.2013 N 66 «Об утверждении стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года и плана ее реализации»; Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20.03.2020 N 202 «О метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения»].

Степень разработанности темы исследования

Проблема стандартизации методов контроля препаратов плазмы крови человека и других биотехнологических лекарственных средств освещена в научных работах ведущих специалистов отрасли [Борисевич И.В. и др., 2015; Меркулов В.А. и др., 2016; Абрамова Е.Г., 2018; Яковлев А.К., 2019; Волкова Р.А. и др., 2020; Кудашева Э.Ю., 2020; Корнилова О.Г., 2020]. В последние годы в реестр ФСО внесены стандарты для контроля фракционного состава, антикомплементарной активности, количества анти-А, анти-В, анти-Д антител, активатора прекалликреина и другие. Однако исследований по созданию ФСО содержания антител IgG человека к вирусу КЭ в нашей стране и за рубежом до настоящего времени не проводилось.

В этой связи разработка ФСО для определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ является актуальной научной задачей, решение которой имеет существенное значение для повышения качества и эффективности рассматриваемой группы лекарственных средств.

Цель исследования

Разработать фармакопейный стандартный образец для определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита.

Задачи исследования

1. Разработать способ получения фармакопейного стандартного образца для определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита.
2. Определить аттестуемые характеристики фармакопейного стандартного образца в реакции торможения гемагглютинации и иммуноферментном анализе.
3. Усовершенствовать методику определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита на основе реакции торможения гемагглютинации.
4. Разработать методику определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита на основе иммуноферментного анализа.
5. Изучить специфическую активность лекарственных препаратов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита с использованием фармакопейного стандартного образца.

Научная новизна диссертационной работы состоит в том, что впервые:

- разработан способ получения ФСО для определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ, который обеспечивает внутрисерийную однородность и стабильность аттестованного значения ФСО в течение 3 лет;
- разработан ФСО содержания антител IgG человека к вирусу КЭ и аттестован двумя методами. Аттестуемые характеристики составили не ниже титра

антител 1:80 с неопределенностью, не превышающей шаг титрования, в реакции торможения гемагглютинации, не менее 200 ЕД/мл с неопределенностью, не превышающей 21 %, в иммуноферментном анализе;

– усовершенствована методика определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ на основе РТГА с использованием разработанного ФСО, что позволяет повысить точность определения титра антител за счет снижения вариабельности результатов;

– разработана методика оценки специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ на основе ИФА, обеспечивающая унификацию данных, полученных с применением разных наборов реагентов.

Приоритет исследования подтвержден патентом РФ на изобретение № 2735782 «Способ получения стандартного образца содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита» от 09.11.2020 г.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость диссертационной работы состоит в обосновании технологических подходов к получению ФСО, обеспечивающих стабильность аттестуемых характеристик в процессе хранения, близость состава и свойств исследуемым препаратам иммуноглобулина человека против КЭ, внутрисерийную однородность. Предложенная методика аттестации ФСО в иммуноферментном анализе может рассматриваться в качестве основы для получения аттестуемой характеристики первичных стандартов. Разработанная математическая модель расчета концентрации IgG к вирусу КЭ позволяет получать результаты, сопоставимые со значениями метода параллельных линий Европейской Фармакопеи (ЕФ), оптимизировать способ обработки данных ИФА.

Практическое значение результатов исследования заключается в применении ФСО для повышения точности и унификации результатов определения основного показателя качества лекарственных препаратов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита и обосновании метода иммуноферментного анализа для оценки специфической активности. Разработанный ФСО может применяться при аттестации вторичных стандартов и валидации методик.

Материалы работы использованы при разработке инструкции по изготовлению, контролю и аттестации ФСО, проектов паспорта и инструкции по применению, что дает возможность осуществлять серийный выпуск продукта.

Методология и методы исследования

Теоретической основой работы стал анализ отечественных и зарубежных публикаций на тему разработки биологических стандартных образцов, технологии производства иммуноглобулинов человека, повышения их стабильности, определения специфической активности, а также нормативной базы в области контроля качества и метрологического обеспечения в сфере обращения лекарственных средств. Для выполнения работы обоснованы технологические приемы получения концентратов IgG к вирусу КЭ, соответствующих отечественным и международным требованиям к ФСО; подобраны условия аттестации первичного и повторных выпусков ФСО и стандартизации методик определения специфической активности; выбраны математико-статистические способы обработки экспериментальных данных. *Объектом исследования* являлись концентраты антител и лекарственные препараты иммуноглобулина человека против КЭ. *Изучаемые явления* – получение, аттестация и применение ФСО, а также специфическая активность иммуноглобулина человека против КЭ.

Для решения поставленных задач использовались биотехнологические, иммунологические, физико-химические, биохимические, микробиологический и статистические *методы исследования*.

Положения, выносимые на защиту

1. Способ получения концентрата IgG, заключающийся в стабилизации раствора иммуноглобулина человека против КЭ *l*-пролином и глицином в количестве по 12,5 г/л, корректировке рН до $5,0 \pm 0,5$, стерильном розливе при непрерывном перемешивании и лиофилизации, позволяет получать ФСО, соответствующий спецификационным нормам, и осуществлять его серийный выпуск.

2. ФСО содержания антител IgG человека к вирусу КЭ с установленными аттестуемыми характеристиками: титром антител не ниже 1:80 и

неопределенностью, не превышающей шаг титрования, в РТГА и концентрацией IgG не менее 200 ЕД/мл с неопределенностью, не превышающей 21 %, в ИФА, и сроком годности не менее 3 лет.

3. Усовершенствованная методика на основе РТГА и разработанная методика на основе ИФА, обеспеченные ФСО, позволяют повысить точность и унифицировать результаты определения специфической активности лекарственных препаратов иммуноглобулина человека против КЭ.

Связь темы диссертации с планом научно-исследовательских работ

Результаты диссертационной работы получены при выполнении государственных заданий на осуществление прикладных научных исследований и разработок при выполнении научно-исследовательских работ ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России: «Совершенствование методов контроля качества препаратов иммуноглобулина человека», № государственной регистрации 01201150082; «Совершенствование методов контроля качества крови донорской, ее компонентов и препаратов», № государственной регистрации 01201451641, и ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России: «Научное обоснование и разработка методологии экспертизы качества, эффективности и безопасности препаратов крови», № государственной регистрации 115111740010, «Совершенствование системы разработки и применения стандартных образцов, предназначенных для оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств», № государственной регистрации 115111740007.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационной работы обеспечена достаточным объемом экспериментальных исследований, использованием средств измерений, прошедших метрологическую поверку, обоснованным применением статистических методов обработки полученных результатов.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Вопросы трансфузиологии и клинической медицины» (Киров, 2012), VII молодежном научно-инновационном конкурсе по программе УМНИК в Кировской области (Киров, 2015), Всероссийской научно-практической

конференции с международным участием, посвященной 55-летию Кировского научно-исследовательского института гематологии и переливания крови «Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины» (Киров, 2015), I Калининградском научном иммунологическом форуме (Калининград, 2016).

Основное содержание диссертации отражено в 12 научных публикациях, из них 3 в рецензируемых научных изданиях, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, и 1 патенте РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 133 страницах машинописного текста, содержит 32 таблицы, 11 рисунков и состоит из введения, 6 глав, заключения, содержащего рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего в себя 152 источника, в том числе 53 зарубежных, 4 приложений.

Личный вклад автора

Все результаты, представленные в диссертации, получены при личном участии автора, которым обосновано направление работы, проведены экспериментальные исследования по разработке ФСО содержания антител IgG человека к вирусу КЭ, осуществлен анализ и интерпретация полученных данных, их статистическая обработка, подготовлены статьи, тезисы конференций, заявка на изобретение. Исследования по аттестации ФСО, разработке и стандартизации методик определения специфической активности выполнены совместно с сотрудниками лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России ведущим микробиологом И.Л. Арефьевой при содействии начальника лаборатории д.м.н. Э.Ю. Кудашевой.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита, его характеристика и роль в экстренной профилактике и терапии инфекции

КЭ – природно-очаговая вирусная инфекция, способная приводить к серьезным поражениям нервной системы. Поскольку заболевание широко распространено не только на территории РФ, но и европейских (27) и азиатских (4) стран, его относят к проблемам мирового здравоохранения [91, 98, 145].

Возбудитель КЭ – высоко патогенный для человека РНК-содержащий оболочечный вирус, относящийся к роду флавивирусов [145]. Его вирион состоит из трех структурных (С, М, Е) и семи неструктурных (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) белков [141]. Ключевой мишенью для вируснейтрализующих антител является поверхностный гликопротеин Е (gE), который отвечает за связывание с клеточными рецепторами при инфицировании [117, 123, 142, 145].

Выделяют три основных субтипа вируса КЭ – дальневосточный, сибирский и европейский [148], которые указаны в порядке убывания тяжести клинических проявлений вызываемого заболевания. На территории РФ циркулируют все три субтипа, доминирующим является сибирский [96].

Наиболее надежным способом профилактики КЭ, рекомендованным Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), признана вакцинация населения, проживающего или временно находящегося в эндемичных регионах. Однако охват населения вакцинацией часто не позволяет достичь требуемого показателя эффективности, равного 95 % [98]. Помимо этого, доля вакцинированных среди пострадавших от присасывания клещей не превышает 8 % [98]. Кроме непривитых или получивших неполный курс вакцинации в особую категорию риска входят лица с нарушением иммунного статуса. В этой связи среди мер по борьбе с КЭ

существенное значение имеют экстренная профилактика и этиотропная терапия иммуноглобулином человека против КЭ [20, 64], который применяется в РФ более 50 лет [66] и входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения [56].

Иммуноглобулин человека против КЭ представляет собой концентрированный раствор иммунологически активной белковой фракции плазмы крови человека, основной компонент которой – IgG, нейтрализующий вирус КЭ [26-28]. Сырьем для получения препарата является плазма крови доноров, безопасная в отношении передачи гемотрансмиссивных инфекций, с титром антител к вирусу КЭ выше 1:10 по данным РТГА. В регионах с интенсивно протекающим эпидемическим процессом ее заготовку проводят методом сплошного скрининга, так как на территориях природных очагов КЭ высок уровень иммунной прослойки населения, сформировавшейся при массовой вакцинации или после перенесенного заболевания. При недостаточном содержании противовирусных антител прибегают к иммунизации доноров соответствующими вакцинами [66].

Выделение иммуноглобулинов из плазмы крови проводят методом этанольного фракционирования при низких температурах [143]. Соблюдение регламентированных требований к производственному процессу позволяет получить целевую фракцию с чистотой более 95 % и минимальным содержанием биологических примесей [77].

Неотъемлемой частью технологического процесса являются этапы обеспечения вирусной безопасности [19, 35, 69]. Помимо тщательного отбора доноров, тестирования их крови, индивидуальных единиц и производственных пулов плазмы человека для фракционирования на наличие маркеров гемотрансмиссивных инфекций с применением высокочувствительных методов анализа, использования карантинизированного или патогенредуцированного сырья [68, 75], обязательны стадии инактивации и/или элиминации вирусов [92, 97]. К ним относятся каприлатная преципитация, пастеризация при низких значениях pH, сольвент-детергентная обработка, нанофильтрация, ионообменная хроматография

[22, 92, 127]. Также регламентирован контроль вирусной безопасности готового препарата [23].

Раствор иммуноглобулина, полученный в процессе фракционирования плазмы, очищают и концентрируют методом тангенциальной ультрафильтрации с использованием плоскорамных фильтрующих элементов с пределом отсечения не выше 150 кДа [78]. После внесения стабилизатора глицина из расчета 22,5 г/л и коррекции pH до нейтральных значений 6,5 - 7,0 проводят стерилизующую фильтрацию с использованием фильтр-капсул с размером пор 0,22 мкм.

Готовые препараты представляют собой 10 - 16 % белковые растворы для внутримышечного введения, содержащие антитела к вирусу КЭ в титре не менее 1:80 по данным РТГА.

Фармакологическое действие иммуноглобулина человека против КЭ определяется биологической активностью основного действующего вещества – антител к вирусу КЭ. Полагают, что в отношении нейтрализации вируса КЭ наиболее активны IgG к белку gE [139, 142]. Именно к этому поверхностному гликопротеину вируса вырабатываются антитела с высокой нейтрализующей активностью и протективным действием [102, 117].

Механизмы нейтрализации вирусов антителами разнообразны. IgG препятствуют инфицированию клеток-мишеней за счет блокирования связывания с клеточными рецепторами [135, 141], способны ингибировать слияние вирусной и эндосомальной мембран [132, 142], а также блокировать высвобождение вирусных частиц из инфицированных клеток, тем самым замедляя распространение вируса [135]. Fc-опосредованные механизмы запуска иммунной защиты приводят к фагоцитозу и последующей инактивации вириона, а также могут вызывать лизис инфицированных клеток через активацию естественных киллеров [121, 129, 136].

Считается, что антителозависимая нейтрализация флавивирусов происходит, когда достаточное количество эпитопов занято антителами [177, 137]. Поэтому возможно предположить наличие прямой связи между протективным действием препарата и содержанием в нем IgG к вирусу КЭ, или его специфической активностью. В этой связи данная характеристика является одним из важнейших

показателей качества иммуноглобулина человека против КЭ. Величину специфической активности ассоциируют с прогнозируемой эффективностью терапевтического действия препарата [77].

Следует отметить, что стехиометрический порог нейтрализации флавивирусов антителами может в значительной степени варьировать из-за различий в пространственной доступности эпитопов, обусловленной сложным строением вириона, его подвижностью и степенью зрелости [106, 117, 137]. Вместе с тем недостаточная занятость антигенных детерминант антителами может снижать эффективность экстренной профилактики и лечения заболевания [103, 136]. И напротив, введение антител в высоких концентрациях – приводит к угнетению иммуногенеза посредством механизмов антитело-опосредованной иммуносупрессии [60, 107]. Необходимость применения специфического иммуноглобулина в оптимальных дозах [105, 137] определяет актуальность изучения связи между специфической активностью препаратов и их протективным действием.

Результаты оценки влияния уровня антител в иммуноглобулинах человека на инфекционную активность вируса КЭ отражены в ряде научных работ. В частности, Г.Н. Леонова и соавт. показано, что специфические IgG в титре 1:100 слабо снижают концентрацию вируса в культуре клеток СПЭВ, тогда как при содержании 1:400 оказывают выраженный нейтрализующий эффект. Образец препарата со специфической активностью 1:3200 полностью задерживает накопление вируса [37]. В дальнейшем авторами было установлено, что полная элиминация вируса при внутриклеточном, вирулицидном, прямом антивирусном и профилактическом действиях происходит при концентрациях антител – 8 Ед/мл, 16 Ед/мл, 32 Ед/мл и 320 Ед/мл соответственно [132]. В этих исследованиях содержание IgG было определено с использованием тест-системы «ВектоВКЭ-IgG», АО «Вектор-Бест» (Россия).

J. Elsterova et al. продемонстрировали, что для иммуноглобулина человека с концентрацией IgG 12500 VIEU/мл наблюдалась 90 % защита мышей от летальной дозы возбудителя, в то время как при содержании IgG 250 VIEU/мл значимый

терапевтический эффект не достигался (концентрация антител к вирусу КЭ определена с использованием тест-системы IMMUNOZYM FSME (TBE) IgG, PROGEN Biotechnik, Германия) [147].

Оценка зависимости протективного эффекта от специфической активности препарата также предпринята в клинико-иммунологических испытаниях [73]. Содержание антител в иммуноглобулине человека против КЭ выражали в условных активных единицах (УАЕ). За 1 единицу принимали 1 г иммунного белка с титром антител 1:80 по данным РТГА. Препараты, включенные в исследование, содержали от 0,70 до 4,48 УАЕ. Было установлено, что курсовые дозы иммуноглобулинами с активностью 0,7 и 1,4 УАЕ малоэффективны при терапии менингеальных форм КЭ. В целом прослеживалась тенденция к уменьшению сроков реализации терапевтического эффекта при возрастании специфической активности препарата.

Несомненно, эти исследования имеют важное значение для определения эффективной дозы антител и совершенствования схем назначения иммуноглобулина человека против КЭ с профилактической и лечебной целью. Следует также отметить, что использование разных единиц измерения концентрации вирусспецифических IgG затрудняет сопоставление величин защитного уровня антител, полученных на основании результатов разных исследований.

Как было отмечено выше, иммуноглобулин человека против КЭ назначают для экстренной профилактики и лечения данного инфекционного заболевания.

Ежегодно экстренную профилактику получают 130 - 150 тыс. пострадавших от укуса клеща [98]. Ее проводят лицам, непривитым или получившим неполный курс вакцинации против КЭ, отметившим присасывание клещей в эндемичных районах, или при подозрении на лабораторное заражение. Препарат назначают в дозе 1,0 мл для детей и 3,0 мл для взрослых (однократно, реже двукратно) в ранние сроки (в течение 72 часов) после предполагаемого инфицирования [26-28]. Эффективность экстренной профилактики КЭ составляет 63,2 - 99,5 % [9, 18, 65, 71, 85, 99] и повышается при увеличении специфической активности препарата [71,

72]. На основании этого высказано предположение о целесообразности назначения иммуноглобулина человека против КЭ с учетом количества содержащихся в нем антител [18]. Дозозависимый эффект применения особенно заметен у детей. Так, иммуноглобулин человека против КЭ со специфической активностью 1:160 - 1:320 оказывал более выраженное защитное действие, чем препарат с титром антител 1:80 [71].

Терапевтические возможности иммуноглобулина человека против КЭ были детально изучены Г.М. Воронковой (2002) и Т.А. Захарычевой (2002). В клинических испытаниях показан лечебный эффект препарата при использовании в ранние сроки после инфицирования в дозах, адекватных тяжести течения заболевания [20]. Результаты проведенных исследований легли в основу инструкции по применению иммуноглобулина человека против КЭ, согласно которой с лечебной целью вводят 0,10 - 0,15 мл препарата на 1 кг веса пациента [26-28]. Курсовые дозы составляют 70 - 130 мл [64, 73]. Между тем при экспериментальном КЭ и в клинических испытаниях отмечалось более выраженное действие препарата при его введении в дозах, превышающих рекомендованные [40, 73]. Повышение эффективности иммунотерапии КЭ возможно также благодаря созданию инфузионной лекарственной формы, так как при внутривенном введении исключаются резорбционные потери иммунного белка и быстро достигается увеличение уровня специфических антител в крови инфицированного [46].

Стоит отметить, что до 2000 гг. за рубежом для экстренной профилактики КЭ применялся Энцегам (FSME-Bulin Immuno AG, Австрия), производимый из плазмы крови доноров, иммунизированных вакцинами на основе штамма Neudörfl европейского субтипа, и отличающийся от отечественных препаратов высокой специфической активностью (1:640 - 1:5120). Этот иммуноглобулин был зарегистрирован и в РФ. Т.А. Захарычевой (2002) показана возможность его применения не только в профилактических, но и в лечебных целях [20].

Потребность в Энцегаме в Европе была снижена благодаря активной иммунизации населения и преобладанию легких форм КЭ [145]. К прекращению выпуска препарата также привели сообщения об усилении флавивирусных

инфекций при действии субнейтрализующих концентраций антител [105, 136, 144]. Следует отметить, что в более поздних исследованиях при экспериментальном КЭ на лабораторных животных и в клинических испытаниях эффекта увеличения инфекционности вируса КЭ, вызванного антителами, не наблюдалось [20, 37, 72, 110, 130, 146].

Между тем рост заболеваемости КЭ, регистрируемый в Европе с 2012 года [145], и отсутствие альтернативных методов этиотропного лечения заболевания, привели к необходимости возобновления исследований по использованию иммуноглобулиновых препаратов для терапии инфекции [128, 145, 146, 147]. Было установлено, что благодаря программам массовой вакцинопрофилактики, производимые в Европе отдельные серии внутривенного иммуноглобулина человека отличаются высоким содержанием вирусспецифических антител и могут применяться для лечения КЭ [146, 147].

Интересно отметить, что отечественными учеными предпринимаются усилия по разработке препарата терапевтического химерного антитела против вируса КЭ [47]. В экспериментах *in vivo* показана эффективность антитела ch14D5 по отношению к трем основным субтипам вируса [111]. В настоящее время планируются клинические исследования этого препарата.

Таким образом, среди мер по борьбе с КЭ существенное значение имеет экстренная профилактика и этиотропная терапия иммуноглобулином человека против КЭ. Сырьем для его получения служит проверенная на отсутствие маркеров гемотрансмиссивных инфекций плазма крови доноров-реконвалесцентов и/или доноров, иммунизированных соответствующими вакцинами. Технология производства препарата основана на методе этанольного фракционирования и включает в себя стадии ультрафильтрационной очистки, инактивации и/или элиминации вирусов, стерилизующей фильтрации. Готовый препарат представляет собой белковый раствор, содержащий IgG, нейтрализующие вирус КЭ. Количество этих антител, или специфическая активность, является важнейшим показателем качества иммуноглобулина человека против КЭ и напрямую связана с его протективным действием. Поскольку объективность оценки специфической

активности играет существенную роль в обеспечении потенциальной клинической эффективности рассматриваемой группы лекарственных средств, необходимо проанализировать существующие методы определения содержания антител к вирусу КЭ.

1.2 Методы определения содержания антител к вирусу клещевого энцефалита

Содержание антител, способных нейтрализовать инфекционные свойства вируса КЭ, наиболее достоверно отражают результаты реакции нейтрализации (РН). Исследование проводят путем введения смеси антиген-антитело животным или в чувствительные тест-объекты (культуру клеток, эмбрионы). По отсутствию повреждающего действия антигенов судят о нейтрализующей активности антител. В методе обычно используют клеточные культуры СПЭВ, Vero E6, ВНК-21, А549 [119, 126]. Результат оценивают визуально по тканевому цитопатическому действию, количеству бляшкообразующих или фокусформирующих инфекционных единиц. Эксперименты *in vivo* выполняют на беспородных белых или линейных мышах [43, 120]. Продолжительность анализа составляет до 7 суток.

В связи с недостаточной объективностью визуальной оценки результатов РН и длительностью постановки, рядом ученых проводились исследования по оптимизации методики. Н. Holzmann et al. предложили несвязавшийся антиген определять с помощью ИФА [115]. S. Vene et al. создали экспресс-тест на основе метода RFFIT с использованием клеток ВНК-21 S13, позволивший сократить время исследования до 24 ч. Авторы установили, что титры вируснейтрализующих антител, полученные с помощью этой методики и традиционной РН, были почти идентичны и коррелировали с результатами РТГА [104].

Вместе с тем на сегодняшний день не существует унифицированной методики количественного определения вируснейтрализующих антител. Лаборатории используют собственные процедуры постановки анализа. N. Litzba et

al. (2014) сравнили 10 вариантов РН, воспроизведенных 8 лабораториями. Протоколы анализа различались модельными антигенами вируса КЭ (использованы тест-штаммы Neudorfl, K-23, Нур, strain 93-783, ir 454 М2 европейского субтипа), инфицирующими дозами, культурами клеток и их концентрациями, способами детекции и учета результатов реакции. Проанализировано 10 образцов сыворотки крови человека и 1 образец моноклональных антител. В итоге показано, что титры вируснейтрализующих антител, полученные с использованием разных протоколов, различались в 5 - 10 раз [119].

Помимо этого, выполнение РН технически сложно, требует наличия высококвалифицированного персонала, а также обеспечения особых условий работы с высокопатогенным вирусом КЭ [58]. Исследование продолжительное и дорогостоящее.

По этим причинам существенно ограничено применение РН для осуществления контроля качества препаратов при их серийном производстве.

С 1970 гг. и до настоящего времени методом оценки специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ, внесенным в нормативную документацию, является РТГА [41]. Определение содержания антител проводят в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов «Диагностикум клещевого энцефалита сухой для РТГА, РСК, РРГ» (АО НПО «Микроген», Россия). Его специфическим компонентом является диагностикум КЭ – антиген вируса, выделенный из мозга инфицированных белых мышей методом боратно-солевой экстракции. Целевой антиген очищают протаминсульфатом или фреоном-113, инактивируют бетапропиолактоном и лиофилизируют [29].

РТГА основана на способности диагностикума КЭ вызывать агглютинацию гусиных эритроцитов при слабокислых значениях рН. В ходе постановки реакции разведения препарата инкубируют с 8 гемагглютинирующими единицами антигена. Результат его взаимодействия с антителами визуализируют внесением эритроцитной суспензии. Свободные гемагглютинины диагностикума вызывают склеивание эритроцитов. С увеличением содержания антител в анализируемой

пробе происходит подавление (торможение) агглютинации. В момент, когда гемагглютинины полностью заняты антителами, наблюдается ее отсутствие, при этом эритроциты образуют плотный осадок на дне лунки планшета. Максимальное разведение препарата иммуноглобулина, которое вызывает полное подавление гемагглютинирующей активности диагностикума КЭ, расценивают как титр антител.

F.X. Heinz et al. (2004) показали в своих исследованиях, что аминокислотные последовательности вируса, отвечающие за феномен агглютинации эритроцитов, локализованы преимущественно в белке gE [123]. Поскольку именно этот поверхностный гликопротеин играет ключевую роль в процессах проникновения вирусного нуклеокапсида в клетку [145], считается, что метод способен выявлять антитела, обладающие нейтрализующей активностью в отношении вируса КЭ.

Вместе с тем необходимо отметить, что выполнение РТГА – достаточно трудоемкий процесс. Преаналитический этап включает в себя двухэтапную обработку образцов 25 % взвесью каолина и эритроцитами гуся для удаления ингибиторов реакции и неспецифических агглютининов, а также двукратное осаждение центрифугированием. Аналитический этап заключается в определении рабочего разведения диагностикума КЭ и самой РТГА. Длительность анализа составляет 1,5 рабочих дня. При этом провести автоматизацию метода достаточно сложно, что ограничивает его использование для тестирования большого количества образцов (более 10 за одну постановку).

Другим лабораторным методом определения антител к вирусу КЭ, который широко применяется для верификации развития заболевания и оценки поствакцинального иммунитета, является ИФА [93, 124]. Метод нетрудоемкий и может быть автоматизирован для исследования большого числа образцов. Продолжительность анализа составляет от 2,5 до 3,5 часов. Результат иммуноферментной реакции детектируется с использованием средств измерения, что исключает субъективность оценки. Для постановки анализа существует широкий спектр наборов реагентов отечественного и зарубежного производства и не требуется использование лабораторных животных. Установлено, что результаты

ИФА хорошо коррелируют с данными реакции нейтрализации [42, 115, 119, 134]. Следовательно, метод позволяет достаточно объективно оценивать содержание протективных антител.

В основе метода лежит специфическое связывание иммобилизованного на твердой фазе антигена вируса КЭ с Fab-фрагментами IgG. К образовавшимся комплексам антиген-антитело присоединяются мышиные моноклональные антитела (mAbs), в основном специфичные к константным регионам тяжелых цепей Fc-фрагмента IgG человека. MAbs, меченные пероксидазой хрена или другим ферментом, в присутствии субстрата ферментной реакции окрашивают раствор. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антител в исследуемом образце и измеряется фотометрически. Содержание IgG к вирусу КЭ рассчитывают по калибровочной кривой или выражают в титре – максимальном разведении образца, при анализе которого оптическая плотность (ОП) выше критической, установленной в соответствии с рекомендациями производителя тест-системы [30-34].

В настоящее время выпускается порядка 20 наборов реагентов для ИФА [101, 113, 119], из них в РФ зарегистрированы две тест-системы отечественного и четыре зарубежного производства [17]. При конструировании тест-систем в основном используется инактивированный вирус или вирусные частицы (антигены), полученные культуральными методами, реже – фрагменты белка Е, выделенные из культурального антигена или рекомбинантные [21, 114, 119]. В зарубежных тест-системах преимущественно применяются штаммы Neudorfl, K23 европейского варианта вируса, несколько тест-систем изготавливают на основе штамма Софьин дальневосточного субтипа [119]. В наборах реагентов отечественного производства используется тест-штамм Софьин или рекомбинантный белок, воспроизводящий иммунодоминантный фрагмент аминокислотной последовательности gE [21].

Специфичность и чувствительность современных тест-систем для ИФА достигают 95,5 - 100,0 %. Сходимость результатов составляет от 8 % до 15 % [113].

В результате сравнения разных коммерческих наборов реагентов зарубежных производителей показано, что в 69 – 89 % случаев они позволяют однозначно определять диагностически значимый уровень IgG [112, 114, 119]. Предполагается, что основной причиной расхождения результатов является отличие технологий получения антигена и нанесения его на твердую фазу. Процесс изготовления иммуносорбента предусматривает инактивацию, в том числе лизис вируса, или селекцию антигенов, содержащих сайты связывания с вируснейтрализующими антителами. Это приводит к изменению структуры и нативной антигенности вируса [116]. Также известно, что соединение антител с эпитопами происходит в результате пространственно-конформационного взаимодействия. Нарушение третичной структуры и пространственные ограничения, возникающие вследствие сорбции антигенов на твердую фазу, могут влиять на эффективность экспонирования различных антигенных детерминант на поверхности иммобилизованных вирусных частиц [21, 116].

Кроме того, инактивированный вирус или его фрагменты могут нести консервативные неструктурные белки, распознаваемые антителами к другим флавивирусам [114, 149]. По данным зарубежных исследований перекрестная реактивность остается серьезным ограничением в серологической диагностике КЭ, так как может приводить к снижению специфичности лабораторных тестов [113, 115, 119]. Между тем распространенность других флавивирусных инфекций в нашей стране крайне низкая [49-52]. Следовательно, возможно исключить влияние перекрестной реактивности на результаты количественного определения вирус специфических IgG в препаратах иммуноглобулина человека против КЭ, которые получают из плазмы крови доноров, проживающих на территории РФ.

Использование в качестве антигена рекомбинантных белков, воспроизводящих иммунодоминантные области белка Е, ответственные за продукцию вируснейтрализующих антител, служит одним из направлений улучшения диагностических характеристик наборов реагентов и способствует их стандартизации. Однако применение иммуносорбентов, изготовленных на основе

коротких фрагментов аминокислотных последовательностей, может снижать чувствительность выявления IgG [101].

Предметом дискуссий остается вопрос влияния штаммовой специфичности модельных антигенов на результаты количественного определения антител к вирусу КЭ. С одной стороны, высок уровень гомологии аминокислотных последовательностей белка gE: вариация внутри субтипа не превышает 2,2 %, а между разными субтипами составляет 3,6 - 5,6 % [138]. При этом в исследованиях N. Litzba et al. (2014) показано, что некоторые наборы реагентов на основе одного штамма вируса могут иметь большие различия в аналитических и диагностических характеристиках, чем произведенные на основе разных субтипов вируса КЭ [119].

С другой стороны, имеются сведения о существенных отличиях в физико-химических свойствах поверхностных белков разных генетических вариантов КЭ [100]. Так, на поверхности gE дальневосточного штамма Софьин локализовано большее количество положительно заряженных аминокислот в сравнении с европейскими штаммами Neudoerfl, Нург и Karlsruhe [113]. Поскольку заряд боковых цепей аминокислотных остатков играет важную роль во взаимодействии с антителом, а также влияет на аффинность образовавшихся связей [7, 100], эти различия могут отражаться на количественном определении IgG при использовании тест-систем на основе разных субтипов вируса КЭ.

Известно, что препараты иммуноглобулина человека производятся из пула плазмы крови доноров, поэтому могут содержать противоклещевые антитела разной специфичности (например, к разным штаммам и антигенным детерминантам вируса). В нашей стране для иммунизации населения преимущественно используются вакцины отечественного производства, изготовленные на основе дальневосточных штаммов – Софьин и 205. Их доля составляет 98,7 %. Зарубежные вакцины на основе европейских штаммов К-32 и Neudoerfl применяются очень ограниченно (0,006 и 0,0006 %). Доля лиц, привитых разными вакцинами, также незначительна – 1,13 % [98]. Помимо этого, для производства препаратов может быть использована плазма крови доноров-реконвалесцентов, которая содержит антитела, специфичные к генетическому

варианту вируса, циркулирующему на данной территории. Как отмечалось ранее, в РФ на большей части природных очагов КЭ доминирует сибирский субтип вируса. Следовательно, возможно предполагать, что в составе иммуноглобулина человека против КЭ преобладают IgG к дальневосточному и сибирскому вариантам вируса.

Вместе с тем ранее было отмечено, что современные диагностикумы сконструированы преимущественно на основе лизатов вируса дальневосточного и европейского субтипов. Однако до сих пор в научной литературе недостаточно сведений о влиянии различий в специфичности модельных антигенов иммуноферментных тест-систем на результат количественного выявления антител к разным штаммам вируса КЭ.

И.П. Ладыженской и соавт. проведено сравнение данных определения специфической активности в трех сериях препаратов с применением тест-систем ВектоБКЭ-IgG (Россия) и NovaLisa TBE/FSME IgG ELISA (Германия), изготовленных на основе антигена штамма Софьин. Содержание антител выражено в титрах – максимальном разведении образца, при котором регистрируется положительный результат иммуноферментной реакции. Титры антител, полученные с использованием тест-системы ВектоБКЭ-IgG, составили 1:12800, с применением зарубежного набора реагентов – от 1:3200 до 1:6400. По мнению авторов, выявленные отличия в специфической активности препаратов могут быть обусловлены особенностями конструирования тест-систем, а также способом обработки результатов с учетом внутренних стандартов, откалиброванных в условных единицах, установленных производителем [10]. Важно также отметить, что в инструкциях по применению наборов реагентов для ИФА отсутствуют указания об их использовании для определения содержания антител в препаратах иммуноглобулина человека против КЭ. В связи с этим необходимо разработать унифицированную методику определения специфической активности и доказать ее пригодность для контроля качества рассматриваемой группы лекарственных средств.

Таким образом, РТГА и ИФА дают достаточно объективную информацию о содержании антител, способных нейтрализовать вирус КЭ. Метод РТГА внесен в нормативные документы производителей и регламентирован для определения специфической активности препаратов. ИФА широко используется для верификации развития инфекции и оценки поствакцинального иммунитета, однако возможность его применения для определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ недостаточно изучена. Представляется целесообразным оценить возможность стандартизации указанных методов анализа.

1.3 Направления совершенствования методик определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита

Определение титра антител к вирусу КЭ в РТГА связано с многоэтапной пробоподготовкой, использованием биологических лабильных компонентов, визуальной оценкой титра антител, что может снижать достоверность и воспроизводимость результатов исследования.

Исходная концентрация IgG может меняться вследствие неоднократных разведений, удаления части реакционной смеси на этапах обработки образцов. В РТГА для индикации степени агглютинации применяют гусиные эритроциты в виде 0,4 % суспензии. Методика анализа не предусматривает стандартизации взвеси по количеству клеток. Вместе с тем избыток эритроцитов может приводить к завышению значения титра антител, недостаток – к занижению. Эритроциты, заготовленные от разных гусей, могут отличаться по способности к агглютинации диагностикумом КЭ. Помимо этого, основной реагент (диагностикум КЭ) нестабилен при комнатной температуре. Значение титра антител определяют визуально по степени агглютинации эритроцитов, поэтому высока доля субъективности в интерпретации результата анализа.

Для исключения влияния указанных факторов на точность определения специфической активности необходимо проводить контроль достоверности результатов анализа. В настоящее время для верификации количественного определения титра антител к вирусу КЭ применяют положительный контрольный образец, входящий в состав набора реагентов. Он представляет собой асцитную жидкость крыс, иммунизированных живым вирусом КЭ [29]. Использование этого контрольного материала имеет ряд недостатков. Так, согласно данным производителя, титр антител положительного контроля обычно равен 1:1280. В то время как аналитический диапазон методики, установленный на основании ретроспективного анализа специфической активности серий иммуноглобулина человека против КЭ, выпущенных в период с 2016 по 2020 гг., составляет от 1:80 до 1:320 [5]. Между тем известно, что оценку правильности результатов реакции наиболее объективно выполнять с использованием контрольных образцов с концентрацией анализируемого вещества, находящейся в диапазоне специфической активности исследуемых препаратов [6, 150]. Помимо этого, существующие различия в репертуаре эпитопов мышинных антител и человеческих [106] определяют необходимость использования в качестве контролей образцов, содержащих IgG человека.

Как было отмечено, оценка содержания антител в иммуноглобулине человека против КЭ возможна с использованием ИФА [10, 88]. Первый протокол определения IgG к вирусу КЭ в ИФА был разработан в начале 1980 гг., на его основе начат выпуск первых тест-систем австрийской компанией Immuno GmbH. Калибровочную кривую строили с использованием стандартной сыворотки крови человека с высоким содержанием антител, которой была присвоена активность 1000 VIEU/мл [125]. Затем производство тест-систем для ИФА стали осуществлять две немецкие компании Progen и IBL. Они использовали первую стандартную сыворотку для калибровки внутренних контрольных образцов. В дальнейшем стандарты в составе новых коммерческих тест-систем калибровались уже по отношению к контролям Progen и IBL. Впоследствии некоторые производители

продолжили использовать VIEU, другие начали оценивать концентрацию IgG в собственных условных единицах.

Позднее, в 2014 году N. Litzba et al. провели сравнение результатов ИФА, полученных с использованием 14 наборов реагентов [119]. Инструкциями по применению семи тест-систем предусматривался расчет концентрации IgG к вирусу КЭ в VIEU/мл, остальных – в единицах производителя. Коэффициенты вариации результатов определения содержания антител, полученные на основании данных этого исследования, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнительный анализ наборов реагентов для иммуноферментного анализа

Производитель	Единицы измерения	Значение $CV_{общ.} / CV_{VIEU/mL}$ (%) для образца №							
		1	2	3	4	5	6	7	8
DRG Diagnostics (Германия)	DU/mL	109 / 40	133 / 43	102 / 7	100 / 23	90 / 21	79 / 26	94 / 40	77 / 30
Novatec Immundiagnostica GmbH (Германия)	NTU/mL								
Microgen GmbH (Германия)	U/mL								
TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. (Чехия)	AU/mL								
Institut Virion\Serion GmbH (Германия)	U/mL								
Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (Германия)	U/mL								
Technoclon GmbH (Австрия)	U/mL								
Seisui Virotech GmbH (Германия)	VIEU/mL								
Euroimmun AG (Германия)	VIEU/mL								
IBL International GmbH (Германия)	VIEU/mL								
Mast Diagnostica GmbH (Германия)	VIEU/mL								
Microgen GmbH (Германия)	VIEU/mL								
PROGEN Biotechnik GmbH (Германия)	VIEU/mL								
TestLine Clinical Diagnostics (Чехия)	VIEU/mL								
Примечание – коэффициент $CV_{общ.}$ рассчитан для результатов определения концентрации IgG к вирусу клещевого энцефалита, выраженных в разных единицах активности; коэффициент $CV_{VIEU/mL}$ вычислен для результатов, выраженных в VIEU/мл.									

Исходя из сведений таблицы 1, для одноименных образцов сыворотки разброс значений концентрации IgG к вирусу КЭ составил от 77 до 133 %. На основании полученных данных очевидна нецелесообразность прямого сравнения

результатов определения содержания антител, выраженных в разных единицах активности. Этот вывод подтверждается другими исследованиями [112, 113, 114, 149]. Вариация данных ИФА, рассчитанных в VIEU/мл, также была высокой – 20 - 40 %, лишь для одной сыворотки этот показатель составил 7 %. Вероятно, высокий разброс значений концентрации IgG обусловлен накоплением погрешности с течением времени, так как калибровка контрольных образцов выполнялась по внутреннему стандарту производителя тест-системы.

В настоящее время невозможно установить, какие единицы измерения наиболее соответствуют эквиваленту активности первой стандартной сыворотки, поскольку ее запас исчерпан. Это указывает на необходимость соотнесения данных лабораторных тестов с внешним стандартом, то есть метрологического обеспечения прослеживаемости результатов анализа.

Подводя итог рассмотрению факторов, влияющих на точность количественного определения IgG к вирусу КЭ в РТГА и ИФА, следует отметить актуальность стандартизации названных методик определения специфической активности. Решение этой задачи неразрывно связано с разработкой и применением ФСО.

В аспекте фармакопейного анализа, это «вещество, посредством сравнения с которыми осуществляется контроль качества лекарственных средств с помощью физико-химических и биологических методов в целях подтверждения соответствия лекарственных средств требованиям нормативной документации <...>» [55]. ФСО призваны обеспечивать приемлемо низкий риск принятия некорректного заключения о качестве готовой продукции [44]. Их применение служит неотъемлемой частью метрологического обеспечения аналитических методик в фармацевтическом производстве [4, 80, 86, 95], так как дает возможность унифицировать результаты определения основного действующего компонента, осуществлять оценку правильности и стабильности работы тест-систем и лабораторного оборудования [2, 54, 67, 84, 87].

Рекомендациями Q2(R1) Международной конференции по гармонизации технических требований и регистрации лекарственных средств (ICH), а также

разработанными на их основе фармакопейными статьями предусмотрено применение ФСО в валидационных исследованиях. В частности, для подтверждения пригодности аналитических методик их назначению на этапах регистрации и внесения изменений в регистрационное досье на лекарственный препарат.

Важно отметить, что результаты большинства иммунологических тестов не могут быть выражены в единицах международной системы, поэтому наиболее надежным способом количественного определения основного компонента иммунобиологических препаратов служит соотнесение со стандартом, аттестованным в установленном порядке. Важнейшим следствием реализации этого принципа является то, что на основании результатов анализа, полученных в разное время, разными лабораториями и разными методами, возможно сделать одно и то же заключение о качестве лекарственного средства [44].

В настоящее время практически все методики определения специфической активности препаратов иммуноглобулина человека обеспечены стандартами, международными или откалиброванными по ним отечественными. На момент начала наших исследований ФСО для определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ отсутствовал.

Заключение по главе 1. Суммируя приведенные данные литературы, можно заключить, что иммуноглобулин человека против КЭ является важным средством экстренной профилактики и специфического лечения данного инфекционного заболевания. Его применение в ранние сроки после инфицирования позволяет предотвратить и/или снизить риск развития тяжелых форм КЭ.

Препарат получают из проверенной на отсутствие маркеров гемотрансмиссивных инфекций плазмы крови доноров-реконвалесцентов и/или доноров, иммунизированных соответствующими вакцинами, с применением методов этанольного фракционирования и мембранной фильтрации. Фармакологическое действие названного лекарственного средства определяется биологическими функциями IgG к вирусу КЭ. Их содержание характеризует основной показатель качества препарата – специфическую активность.

Нормативной документацией регламентирована оценка специфической активности методом РТГА. Выполнение исследования связано с использованием биологических лабильных реагентов, применением нестандартизованной взвеси эритроцитов гуся, а также визуальной оценкой результата реакции, что в свою очередь может быть причиной снижения точности определения титра антител.

Содержание IgG к вирусу КЭ возможно определять методом ИФА, для выполнения которого существуют тест-системы отечественного и зарубежного производства. Их изготавливают на основе штаммов дальневосточного и европейского субтипов вируса КЭ или рекомбинантных белков, воспроизводящих антигенные детерминанты gE. Отсутствие единого стандарта для калибровки контрольных образцов привело к тому, что результаты количественного определения IgG, полученные с использованием разных наборов реагентов, сильно различаются, их прямое сравнение нецелесообразно. Кроме этого, в инструкциях по применению тест-систем для ИФА нет указаний о порядке их использования для определения антител в иммуноглобулине человека против КЭ. Все это серьезно затрудняет внедрение метода на иммунобиологических производствах для контроля специфической активности препарата.

Развитие системы метрологического обеспечения в сфере обращения лекарственных средств неразрывно связано с разработкой и утверждением ФСО. Они необходимы для обеспечения прослеживаемости и унификации результатов контроля качества лекарственных средств. ФСО содержания антител IgG человека к вирусу КЭ за рубежом и в РФ до настоящего времени отсутствовал. Разработка технологии его получения, аттестация и применение в методиках оценки специфической активности является актуальной научной задачей, решение которой будет способствовать стандартизации выпускаемых в РФ препаратов иммуноглобулина человека против КЭ по показателю качества «специфическая активность».

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При разработке биотехнологических приемов получения ФСО содержания антител IgG человека к вирусу КЭ руководствовались WHO Technical Report Series № 932, 2006 [150], Федеральным законом от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» [55], Приказом Минпромторга России от 14.03.2013 № 916 «Об утверждении правил надлежащей производственной практики» [57], Рекомендацией коллегии Евразийской экономической комиссии от 01.03.2021 № 6 «О руководстве по асептическим процессам в фармацевтическом производстве» [53].

Контроль и аттестацию ФСО проводили согласно ОФС.1.1.0007.18 «Стандартные образцы» [89], а также с учетом положений ГОСТ 8.315–2019 «Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения» [12], ГОСТ 8.531–2002 «Стандартные образцы состава монолитных и дисперсных материалов. Способы оценивания однородности» [14], ГОСТ 8.532–2002 «Стандартные образцы состава веществ и материалов. Межлабораторная метрологическая аттестация» [13].

Валидацию методик определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ выполняли в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [6] и Руководством по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств [83].

2.1 Объекты исследования

В качестве объектов исследования рассматривали кандидатов в ФСО – стабилизированные лиофилизаты полупродукта иммуноглобулина человека против КЭ разного компонентного состава (480 образцов), а также три экспериментальные серии ФСО (750 флаконов).

Помимо этого, с использованием ФСО изучали специфическую активность следующих лекарственных препаратов:

- иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита, раствор для внутримышечного введения (АО НПО «Микроген», Россия) – 41 серия;
- иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита, раствор для внутримышечного введения (ГБУЗ «ЧОСПК», Россия) – 36 серий;
- иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита, раствор для внутримышечного введения (ГБУЗ СО «ОСПК», Россия) – 6 серий.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Методы получения кандидатов в фармакопейный стандартный образец

Концентраты антител к вирусу КЭ получали методом этанольного фракционирования в соответствии с Промышленным регламентом на производство препарата до стадии ТП.9.2 [24]. В раствор иммуноглобулина вносили вспомогательные вещества и корректировали величину рН. Стерилизующую фильтрацию проводили в асептических условиях на стандартном оборудовании фирмы «Millipore» (США) с использованием фильтр-капсул с размером пор 0,22 мкм (Sartopore[®] 2 Gamma MidiCaps, Германия). Раствор разливали по 1,6 мл перистальтическим насосом-дозатором МДП-200 Мини (ООО «Аврора Парк Инжиниринг», Россия) в пенициллиновые флаконы для лекарственных средств (ТУ 9461-003-83426370-2012).

В контрольные емкости строго вертикально устанавливали датчики температуры. Металлические поддоны с флаконами помещали в стерильный бумажный пакет для стерилизации и загружали в морозильный ларь VT-327 (Vestfrost, Дания). Заморозку и закалку продукта проводили при температуре минус $(40 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 24 часов. Затем поддоны размещали на полке камеры установки для лиофильного высушивания LZ-45 (Frigera, Чехия).

Змеевик десублиматора охлаждали до минус (55 ± 5) °С, полки стойки – до минус (30 ± 5) °С. Камеру закрывали крышкой и через 30 - 40 минут включали вакуумный насос. При достижении вакуума 0,30...0,15 Торр, температуры материала минус (40 ± 5) °С включали систему нагревания. Процесс высушивания проводили в течение (28 ± 2) ч до температуры образца (30 ± 3) °С при значении вакуума $(0,15 \pm 0,05)$ Торр. Все флаконы плотно укупоривали стерильными резиновыми пробками модели 3 ИСО и завальцовывали алюминиевыми колпачками.

2.2.2 Методы исследования свойств фармакопейного стандартного образца

Содержание антител к вирусу КЭ определяли в РТГА в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов «Диагностикум клещевого энцефалита сухой для РТГА, РСК, РРГ» (АО «НПО «Микроген», Россия) и иммуноферментным методом с использованием наборов реагентов:

- ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG (НПО «Диагностические системы», Россия),
- ВектоВКЭ-IgG (АО «Вектор-Бест», Россия),
- Anti-TBE Virus ELISA (Euroimmun AG, Германия),
- TBEV/FSME IgG ELISA (IBL International GmbH, Германия),
- FSME/TBE Virus IgG (Institute Virion\Serion GmbH, Германия),
- NovaLisa FSME / TBE IgG (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Германия),

и комплекта оборудования производства Bio-Rad Laboratories Inc., США.

Исследуемые образцы тестировали в серийных 1,5-кратных или 2-кратных разведениях. Этапы инкубации, промывки лунок планшета от несвязавшихся компонентов реакции, остановку реакции и детекцию аналитического сигнала осуществляли согласно инструкциям по применению соответствующих наборов реагентов.

Потерю в массе при высушивании (остаточную влажность) определяли гравиметрическим методом с использованием шкафа вакуумного сушильного УТ-4630V (ULAB, Китай) [76].

Для анализа растворимости лиофилизаты антител восстанавливали в воде очищенной, периодически перемешивая содержимое флакона вращательными движениями до полного исчезновения сухого вещества, и регистрировали время растворения [81].

Прозрачность и цветность измеряли спектрофотометрически в видимой части спектра на колориметре фотоэлектрическом марки КФК-2УХЛ4.2 (АО «Загорский оптико-механический завод», Россия) в кюветах с толщиной оптического слоя 3 мм при длине волны 540 нм и 400 нм соответственно; концентрацию водородных ионов (рН) – потенциометрически с применением анализатора жидкости Эксперт-001-3 (НПП «Эконикс-Эксперт», Россия) [23].

Определение содержания общего белка выполняли колориметрическим методом с биуретовым реактивом с использованием колориметра фотоэлектрического марки КФК-2УХЛ4.2 (АО «Загорский оптико-механический завод», Россия) [36].

Электрофоретическую однородность оценивали методом электрофореза [62] на устройстве УЭФ-01-«Астра» (НПЦ «Астра», Россия) с использованием «Набора реагентов для определения белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на мембранах из ацетата целлюлозы» (НПЦ «Эко-Сервис», Россия). Результаты регистрировали сканированием с последующей обработкой данных в среде программного обеспечения «Анализ фракций сыворотки крови» (НПЦ «Астра», Россия).

Относительное содержание фракций агрегатов, ди- и мономеров и фрагментов иммуноглобулина определяли методом гель-фильтрационной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ГФ-ВЭЖХ) [61] с помощью колонки Zorbax GF-450 (9,4 × 250 мм) (Agilent Technologies, США). В качестве подвижной фазы использовали 0,1 М фосфатный буфер. Скорость элюции составляла 0,5 мл/мин. Регистрацию хроматографического разделения осуществляли при длине волны 280 нм с использованием диодно-матричного детектора, входящего в состав системы для ГФ-ВЭЖХ (Agilent Technologies,

США). Хроматограммы обрабатывали в программе ChemStation (Agilent Technologies, США).

Для определения фракционного состава испытуемые образцы разводили 0,9 % раствором натрия хлорида до 1 % концентрации. Исследование проводили методом иммуноэлектрофореза в агаровом геле [25] с использованием набора реагентов Поли-ИЭФ «Сыворотка для иммуноэлектрофореза против сывороточных белков крови человека сухая» (АО «НПО «Микроген», Россия) и аппарата марки ПЭФ-3 (ОАО «Физприбор», Россия).

Стерильность определяли методом прямого посева образцов, разведенных в 10 раз, с инкубацией в течение не менее 14 суток при температуре $(32,5 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$ в жидкой тиогликолевой среде и при температуре $(22,5 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$ в среде Сабуро [90].

ФСО каждой экспериментальной серии контролировали на отсутствие маркеров гемотрансмиссивных инфекций методом иммунохемилюминисцентного анализа с использованием анализаторов cobas e 411 (Roche Diagnostics International Ltd., США) согласно инструкциям по применению соответствующих наборов реагентов. Верификацию результатов осуществляли с помощью стандартных панелей и контрольных образцов.

Точность розлива определяли весовым методом. Для этого 20 флаконов обрабатывали 70 % этиловым спиртом и помещали в эксикатор на 3 часа. Вскрытые емкости с сухим веществом взвешивали на аналитических весах АДВ-200М («ГОСМЕТР», Россия). Содержимое удаляли, флаконы промывали и ополаскивали водой очищенной. После этого выдерживали в шкафу вакуумном сушильном УТ-4630V (ULAB, Китай) при температуре 100 - 105 °С до постоянной массы.

Для выбора оптимального состава стабилизаторов использовали метод ускоренного старения, основанный на законах кинетики химических реакций [96]. Образцы выдерживали при температурах 30 °С, 45 °С и 56 °С в термостатах суховоздушных марки ТС-1/80-СПУ (ОАО «Смоленская СКТБ СПУ», Россия). Динамику специфической активности оценивали по результатам определения содержания антител к вирусу КЭ методом ИФА с использованием тест-систем ВектоВКЭ-IgG (АО «Вектор-Бест», Россия).

Для анализа долгосрочной стабильности лиофилизаты антител хранили при температуре от 2 до 8 °С в холодильниках фармацевтической линии Paracels (Pozis, Россия). Для определения «базовой линии» активности образцы помещали в низкотемпературный морозильный шкаф модели VTS 098 (Vestfrost Solutions, Дания) при температуре минус (80 ± 2) °С. Специфическую активность контролировали в РТГА с использованием наборов реагентов «Диагностикум клещевого энцефалита сухой для РТГА, РСК, РРГ» (АО «НПО «Микроген», Россия) и методом ИФА с применением тест-систем ВектоВКЭ-IgG (АО «Вектор-Бест», Россия).

2.2.3 Методы обработки результатов исследования

Статистическую обработку данных, полученных в ходе исследования, проводили с использованием редактора MS Excel (Microsoft, США) и пакета прикладных программ Statistica 12.0 (StatSoft Inc, США). Расчет содержания IgG к вирусу КЭ в исследуемых образцах по отношению к стандарту осуществляли методом параллельных линий с применением программы ПАРАЛАЙН (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, авторское свидетельство 2006612065). За величину уровня значимости статистических гипотез принимали 0,05.

Описательный анализ данных осуществляли с использованием общепринятых величин: среднего арифметического (\bar{X}), медианы (Me), среднего геометрического (Ge), стандартного отклонения (s), коэффициента вариации (CV), границ доверительного интервала среднего значения ($\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$) [11].

Величину среднего геометрического коэффициента вариации рассчитывали по формуле:

$$GCV = (10^s - 1) \times 100 \%, \quad (2.1)$$

где s – стандартное отклонение десятичных логарифмов титров антител.

Характер распределения в выборках оценивали с помощью W -критерия Шапиро – Уилка. При $p > 0,05$ распределение исследуемого признака считали нормальным [82].

В случае нормального распределения переменных в выборках сравнение данных проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (*ANOVA*), предварительно оценив равенство внутригрупповых дисперсий с использованием теста Левена (*Levene test*) [82]. В других случаях проверку значимости различий осуществляли с применением *U*-критерия Манна – Уитни (для двух групп) или критерия Краскела – Уоллиса (для трех и более групп).

Степень связи между данными, полученными в результате исследования, оценивали с помощью коэффициентов корреляции Пирсона (r) или Спирмена (r_s). Параметры уравнения регрессии определяли по методу наименьших квадратов в предположении о линейном характере зависимости переменных x и y :

$$y = b x + a, \quad (2.2)$$

где x – независимая переменная уравнения;
 y – зависимая переменная уравнения;
 b – угловой коэффициент уравнения;
 a – свободный член уравнения.

Линейность полученных моделей оценивали с помощью коэффициента детерминации/линейной аппроксимации (R^2).

Определение точности розлива

Для оценки точности розлива ФСО рассчитывали коэффициент вариации CV по формуле:

$$CV = \frac{s \cdot 100}{\bar{X}} \quad (2.3)$$

где s – стандартное отклонение;
 \bar{X} – среднее арифметическое значения массы сухого вещества во флаконе, мг.

Оценка внутрисерийной однородности

Оценку внутрисерийной однородности ФСО проводили на основании положений ГОСТ 8.531–2002 [14], оптимизировав математическую модель с учетом методологии исследования. Рассчитывали среднее арифметическое значение \bar{X} всех результатов измерения ОП по формуле:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{n=1}^N \sum_{j=1}^J x_{nj}}{N \cdot J} \quad (2.4)$$

где x_{nj} – результат измерения ОП;
 N – количество исследуемых образцов, равное 20;
 J – количество аналитических серий, равное 2;

и среднее арифметическое \bar{X}_N для каждой аналитической серии по формуле:

$$\bar{X}_N = \frac{\sum_{j=1}^J x_{nj}}{J} \quad (2.5)$$

Затем вычисляли сумму квадратов отклонений SS_e результата измерения от среднего в аналитической серии по формуле:

$$SS_e = \sum_{n=1}^N \sum_{j=1}^J (x_{nj} - \bar{X}_N)^2 \quad (2.6)$$

и сумму квадратов отклонений SS_H среднего в аналитической серии от среднего всех результатов измерения ОП по формуле:

$$SS_H = J \cdot \sum_{N=1}^n (\bar{X}_N - \bar{X})^2 \quad (2.7)$$

Усредненные значения квадратов отклонений \overline{SS}_e и \overline{SS}_H рассчитывали по формулам:

$$\overline{SS}_e = \frac{SS_e}{[N(J-1)]} \quad (2.8)$$

$$\overline{SS}_H = \frac{SS_H}{(N-1)} \quad (2.9)$$

Затем вычисляли стандартную неопределенность от неоднородности ФСО u_h по формуле (2.10) при $\overline{SS}_H \geq \overline{SS}_e$ или по формуле (2.11) при $\overline{SS}_H < \overline{SS}_e$:

$$u_h = \sqrt{\frac{\overline{SS}_H - \overline{SS}_e}{J}} \quad (2.10)$$

$$u_h = \frac{1}{3} \sqrt{\overline{SS}_e} \quad (2.11)$$

Относительную величину неопределенности от неоднородности ФСО $u_{h\%}$ определяли по формуле:

$$u_{h\%} = \frac{u_h}{\bar{X}} \times 100 \% \quad (2.12)$$

Определение аттестуемой характеристики ФСО методом РТГА

Границы доверительного интервала медианы рассчитывали по формулам согласно [16]:

$$A_{min} = X_k \quad (2.13)$$

$$A_{max} = X_{m+n-k+1} \quad (2.14)$$

где A_{min} – нижняя граница неопределенности аттестованного значения ФСО;
 n, m – число результатов определения титра антител к вирусу КЭ в двух лабораториях ($n = 24, m = 21$);
 k – номер порядковой статистики;
 X_k – k -тое значение титра антител к вирусу КЭ вариационного ряда $X_1 \leq X_2 \leq \dots X_i \leq \dots X_{m+n}$;
 A_{max} – верхняя граница неопределенности аттестованного значения ФСО;
 $X_{m+n-k+1}$ – $(m + n - k + 1)$ -тое значение титра антител к вирусу КЭ вариационного ряда $X_1 \leq X_2 \leq \dots X_i \leq \dots X_{m+n}$;
 A_{min} – нижняя граница неопределенности аттестованного значения ФСО.

Определение аттестуемой характеристики ФСО методом ИФА

Согласно статистической модели (2.2) строили функции калибровки, где y – коэффициент разведения ФСО ($y_1 = 1, y_2 = 0,5, y_3 = 0,25, y_4 = 0,125$); x – значение ОП. Коэффициенты b и a уравнения считали значимыми при $p < 0,05$ [45].

Проверяли адекватность функций калибровки в предположении о постоянстве стандартного отклонения остатков [15]. Для этого по формулам, приведенным ниже, рассчитывали:

– отклонение результата измерения ОП от теоретического:

$$\theta_{iq} = x_{iq} - \hat{x}_q \quad (2.15)$$

$$\hat{x}_q = (y_q - a)/b \quad (2.16)$$

где θ_{iq} – отклонение фактического значения ОП от теоретического, вычисленного по уравнению калибровки;
 x_{iq} – фактическое значение ОП для i -того образца стандарта в q -том разведении;
 \hat{x}_q – значение переменной x в q -том разведении ФСО, вычисленное по уравнению калибровки;
 y_q – коэффициент разведения ФСО ($y_1 = 1, y_2 = 0,5, y_3 = 0,25, y_4 = 0,125$);

– сумму квадратов отклонений взвешенных остатков SSE :

$$SSE = \sum_{m=1}^m \theta_{iq}^2 \quad (2.17)$$

где m – количество измерений, полученных лабораторией в одной серии аттестационных испытаний, равно 32;

– сумму квадратов отклонений чистой ошибки SSP :

$$SSP = \sum_{m=1}^m (x_{iq} - \bar{x}_q)^2 \quad (2.18)$$

где \bar{x}_q – среднее значение ОП в q -том разведении ФСО;

– общую сумму квадратов отклонений SST :

$$SST = \sum_{m=1}^m (x_{ijq} - \bar{X})^2 \quad (2.19)$$

где \bar{X} – среднее значение ОП;

– сумму квадратов отклонений от функции калибровки SSR :

$$SSR = SST - SSE \quad (2.20)$$

– постоянную дисперсию остатков s_e^2 :

$$s_e^2 = \frac{SSE}{mn-2} \quad (2.21)$$

– дисперсию, вызванную нарушением предположения о постоянстве стандартного отклонения остатков s_{Δ}^2 :

$$s_{\Delta}^2 = \frac{SSE-SSP}{n-2} \quad (2.22)$$

– дисперсию чистой ошибки s_p^2 :

$$s_p^2 = \frac{SSP}{n(m-1)} \quad (2.23)$$

– критерий Фишера для функции калибровки $F_{\text{калибр.}}$:

$$F_{\text{калибр.}} = \frac{s_{\Delta}^2}{s_p^2} \quad (2.24)$$

Вычисленное значение критерия Фишера для функции калибровки $F_{\text{калибр.}}$ сравнивали с критическим $F(P; n-2; mn-n)$. Если условие $F_{\text{калибр.}} \leq F_{\text{табл.}}$ не выполнялось, проводили исключение выпадающих значений.

Значения коэффициентов активности k_a рассчитывали по формуле:

$$k_a = \frac{y_i}{y_q} \quad (2.25)$$

где y_i – величина разведения ФСО, рассчитанная по функции калибровки.

Исследование стабильности ФСО в ускоренных испытаниях

Предполагали, что активность образцов при определенной температуре со временем уменьшается по уравнению мономолекулярной реакции:

$$P_\tau = P_0 \cdot e^{-K_T \tau} \quad (2.26)$$

После логарифмического преобразования уравнения (2.26) получали уравнение (2.27), которое использовали для расчета констант скорости инактивации K_T кандидатов в ФСО:

$$K_T = 2,303 \cdot \frac{\lg P_0 - \lg P_\tau}{\tau}, \quad (2.27)$$

где P_0 – исходная активность образца, равная 100 %;
 P_τ – активность образца после его хранения в течение времени τ , %;
 τ – срок хранения образца, сутки.

Зная три константы K_T при трех разных температурах, строили графики зависимостей $\lg K_T = f\left(\frac{1}{T}\right)$ согласно модели Аррениуса:

$$\lg K_T = \lg K_0 - \frac{E}{R} \cdot \frac{1}{T}, \quad (2.28)$$

где K_0 – эмпирическая константа;
 E – энергия активации реакции, Дж/моль;
 R – газовая постоянная, равная 8,314 Дж/моль · К;
 T – абсолютная температура, К.

Методом экстраполяции для каждого образца определяли K_T при предполагаемой температуре хранения 4 °С (277 К) и рассчитывали время, в течение которого концентрация активного вещества уменьшается на 5 % (прогнозируемый срок годности кандидатов в ФСО).

ГЛАВА 3 РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ФАРМАКОПЕЙНОГО СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

3.1 Обоснование способа получения фармакопейного стандартного образца

На основе технических докладов ВОЗ [150, 151] и положений отечественных нормативных документов [12, 13, 14, 89] сформулированы ключевые требования к ФСО:

- близость по составу и свойствам объектам стандартизации – препаратам иммуноглобулина человека против КЭ;
- стабильность (постоянство содержания антител при хранении);
- внутрисерийная однородность.

С учетом первого принципа за основу получения ФСО принята технология производства иммуноглобулина человека против КЭ, которая включает в себя отбор иммунной плазмы крови доноров, безопасной в плане передачи гемотрансмиссивных инфекций, выделение IgG методом этанольного фракционирования, ультрафильтрационную очистку и концентрирование целевого продукта. При этом требуемый уровень специфической активности ФСО должен составлять не ниже титра антител 1:80, исходя из нормативных требований производителей иммуноглобулина человека против КЭ [5].

Известно, что в процессе разделения компонентов плазмы крови нативные IgG подвержены конформационным перестройкам вследствие изменений поверхностного электрического заряда и структуры гидратной оболочки на этапах фракционирования, а также трансмембранного давления на стадиях ультрафильтрации [39, 108]. Помимо этого, вероятно частичная агрегация, димеризация и фрагментация IgG, которые усиливаются в процессе хранения и могут приводить к нежелательному снижению специфической активности ФСО с течением времени.

Для поддержания стабильности иммунобиологических препаратов в биотехнологической практике широко применяется метод лиофилизации. Международные биологические ФСО, предназначенные для контроля качества иммуноглобулина человека, выпускаются в форме лиофилизатов. К несомненным преимуществам сухой формы ФСО в сравнении с жидкой относятся повышение стабильности, возможность увеличения срока годности и как следствие экономия донорского ресурса, а также снижение рисков изменения свойств антител при отклонении условий хранения от регламентированных.

Неотъемлемой частью разработки способа получения лиофилизированной формы ФСО является выбор стабилизаторов. В качестве таких веществ наиболее часто используются низкомолекулярные соединения. Эти наполнители создают окружение биомолекул на подобие гидратной оболочки, тем самым экранируя IgG от межбелковых контактов, химических реакций и действия протеаз [1, 74].

Кроме того, в ряде исследований показана высокая стабильность молекул антител при слабокислом значении pH [70, 118, 133]. Корректировка этого показателя внесена в технологическую схему производства ФСО.

С целью обеспечения внутрисерийной однородности введена стадия перемешивания продукта на этапе стерильного розлива и контроля точности наполнения флаконов.

На основании вышеизложенного сформулированы основные этапы разработки способа получения ФСО:

- выделение и концентрирование IgG из иммунной плазмы крови доноров в соответствии с промышленным регламентом производства иммуноглобулина человека против КЭ до стадии внесения вспомогательных веществ,
- приготовление кандидатов в ФСО, различающихся по составу стабилизаторов, содержанию белка и уровню специфической активности,
- проведение корректировки pH, стерильного розлива при постоянном перемешивании продукта и контроле его точности,
- лиофильное высушивание растворов.

По результатам исследования стабильности запланирован выбор компонентного состава защитной среды, обеспечивающего наилучшую сохранность специфической активности ФСО.

3.2 Выбор стабилизатора фармакопейного стандартного образца

В качестве стабилизаторов антител, получаемых из плазмы крови доноров, чаще всего применяют моно-, дисахара и аминокислоты [3, 122]. Ранее при разработке сухой формы иммуноглобулина человека против КЭ для внутривенного введения изучено влияние на сохранность антител к вирусу КЭ однокомпонентных (5 % сахарозы, 5 % глюкозы, 10 % мальтозы, 2,25 % и 1 % глицина) и двухкомпонентных (глюкозы и глицина в соотношениях 1:0,5, 2:2,25) наполнителей. По данным этих исследований, среди перечисленных стабилизаторов наилучшим протективным действием обладал 2,25 % глицин [79]. Такой же состав защитной среды выбран при оптимизации технологии получения антирабического иммуноглобулина [1]. Показано также, что вещества углеводной природы увеличивают длительность процесса лиофилизации из-за стеклования растворов антител [63], что может приводить к снижению растворимости и возрастанию энергозатрат, поэтому их не рассматривали в качестве наполнителей в процессе разработки ФСО.

При выборе стабилизаторов обратили внимание на опыт успешного применения амфифильных аминокислот в качестве защитных сред для растворов IgG [131]. Так, раствор внутривенного иммуноглобулина человека, стабилизированный *l*-пролином, сохранял свои свойства в течение трех лет даже при комнатной температуре [118]. Протективное действие *l*-пролина связывают с тем, что гидрофобные участки этой аминокислоты способны взаимодействовать с подобными антигенсвязывающими доменами IgG, препятствуя образованию димеров и снижению специфической активности препарата [131].

В связи с вышеизложенным, изучена сохранность лиофилизатов антител IgG к вирусу КЭ, стабилизированных глицином и *l*-пролином в разных соотношениях.

В соответствии с промышленным регламентом получили полуфабрикат иммуноглобулина человека против КЭ с содержанием белка 97 г/л и специфической активностью 1:160, который разделили на 4 части, две из них развели 0,9 % раствором натрия хлорида приблизительно в соотношении 1:1 до ожидаемой концентрации белка 50 г/л. Полученные таким образом растворы кандидатов в ФСО стабилизировали смесью глицина и *l*-пролина до конечных концентраций 12,5 г/л или глицином – до 25,0 г/л, корректировали значение рН до 5,0, в асептических условиях растворы подвергали стерилизующей фильтрации. Затем при постоянном перемешивании разлили во флаконы по 1,6 мл, визуально контролирую уровень жидкости в каждой емкости. Далее образцы заморозили и сублимационно высушили.

Известно, что наилучшая стабильность при длительном хранении биологических ФСО достигается при проведении процесса высушивания до показателя остаточной влажности 1 % [150]. Однако при сильном обезвоживании продукта может существенно возрасти время растворения сухого вещества, поэтому допустимым считали повышение значения названного показателя до 5 %.

В качестве прототипа использован режим лиофилизации, отработанный при экспериментальном производстве иммуноглобулина человека против КЭ [79]. Изменения касались типа используемых флаконов и объема наполнения. Для флаконов с диаметром дна 22 мм при высоте столбика жидкости 7 мм объемом дозирования раствора ФСО составил 1,6 мл.

Флаконы закрывали стерильными резиновыми пробками и завальцовывали алюминиевыми колпачками. В результате получили 4 кандидата в ФСО (примерно по 120 флаконов каждого), различающихся по составу стабилизаторов, времени растворения, цветности и прозрачности жидкости после регидратации, содержанию белка и специфических антител (таблица 2).

Таблица 2 – Основные свойства кандидатов в ФСО

Наименование характеристики	Кандидат в ФСО, состав стабилизатора			
	1	2	3	4
	12,5 г/л глицина 12,5 г/л <i>l</i> -пролина		25,0 г/л глицина	
Содержание белка, г/л (n = 5)	47,4 ± 1,2	93,0 ± 2,2	51,0 ± 0,9	95,0 ± 2,3
Описание	Аморфная масса белого цвета			
Остаточная влажность, % (n = 5)	0,85 ± 0,06	0,79 ± 0,06	0,87 ± 0,05	0,73 ± 0,04
Время растворения, минут (n = 5)	7,5 ± 0,5	9,0 ± 0,8	5,5 ± 0,3	6,0 ± 0,5
pH	5,04	5,02	5,02	5,02
Цветность, ед. ОП (n = 5)	0,059 ± 0,003	0,127 ± 0,010	0,083 ± 0,008	0,140 ± 0,018
Прозрачность, ед. ОП (n = 5)	0,024 ± 0,002	0,048 ± 0,007	0,038 ± 0,003	0,046 ± 0,010
Специфическая активность до/после лиофилизации (n = 3)	1:80/1:80	1:160/1:160	1:160/1:160	1:160/1:160
Точность розлива, % (n = 8)	0,67	0,71	0,67	1,00

Согласно данным таблицы 2, лиофилизация проведена до требуемой величины остаточной влажности, не превышающей 1 %. Кандидаты в ФСО представляли собой аморфную массу белого цвета, равномерным слоем прилегающую к стенкам флакона. После регидратации растворы слегка опалесцировали. Для образцов, стабилизированных глицином, время растворения не превышало 6 минут. Кандидаты в ФСО с двухкомпонентным наполнителем растворялись несколько хуже: вариант стабилизации 1 – 7,5 минут, 2 – 9 минут. Величина pH после лиофилизации практически не изменилась и составляла около 5,0. Содержание белка соответствовало 47 г/л и 57 г/л для кандидатов в ФСО 1 и 3; 93 г/л и 95 г/л для кандидатов в ФСО 2 и 4 соответственно. Отмечено, что с увеличением концентрации белка в незначительной степени снижалась растворимость и повышалась цветность растворов. Сублимационное высушивание не привело к снижению содержания антител к вирусу КЭ: специфическая активность по данным РТГА первого кандидата в ФСО составила 1:80, остальных – 1:160.

На следующем этапе работы изучена сохранность свойств образцов методом ускоренных испытаний, позволяющим выбрать наиболее эффективный способ

стабилизации за непродолжительный период времени [151]. В основе метода лежит предположение о том, что снижение активности вещества подчиняется законам кинетики химических реакций и зависит от температуры, что позволяет моделировать длительное хранение образцов выдерживанием при нагревании.

Ускоренные испытания стабильности моделировали при температурах 30 °С, 45 °С и 56 °С. Значимые изменения содержания антител к вирусу КЭ зарегистрированы на 210 сутки хранения. С учетом данных динамики специфической активности построены зависимости логарифма константы инактивации от обратной температуры (кривые Аррениуса) (рисунок 1).

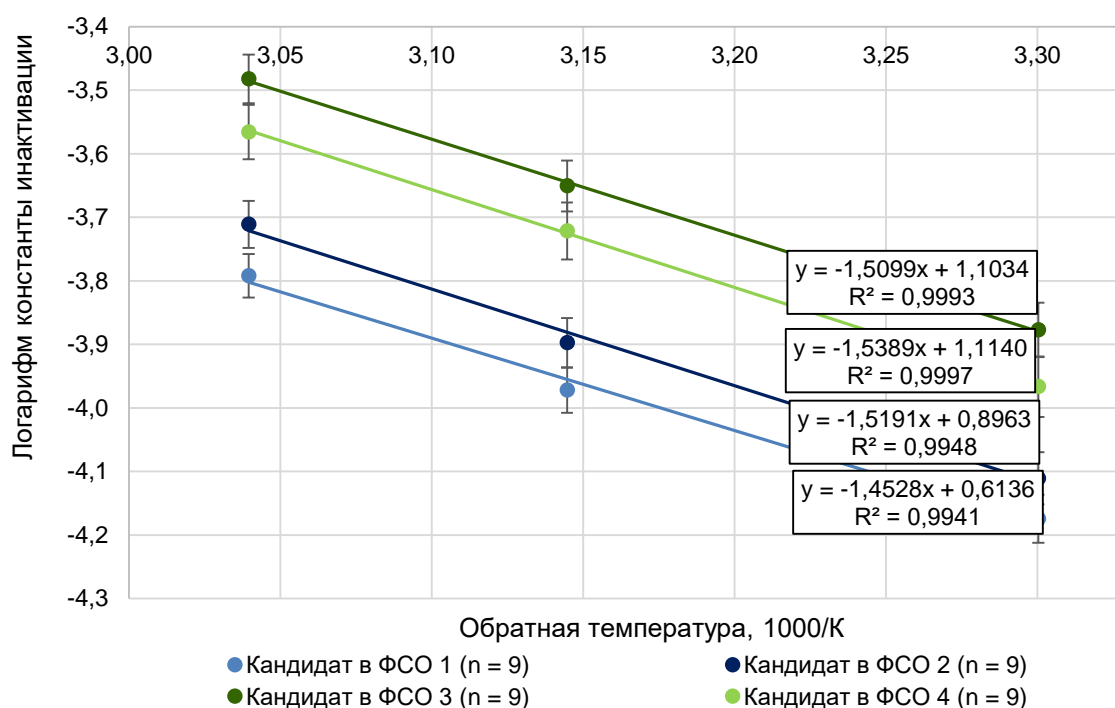


Рисунок 1 – Зависимость логарифма константы инактивации от обратной температуры в условиях ускоренных испытаний стабильности

Согласно графическим данным, представленным на рисунке 1, кривые Аррениуса кандидатов в ФСО визуально параллельны и имели относительно близкие углы наклона, что указывало на пригодность выбранной модели ускоренных испытаний для адекватного сравнения разных вариантов стабилизации ФСО.

Методом экстраполяции для каждого образца рассчитаны константы инактивации при предполагаемой температуре хранения 4 °С и прогнозируемые сроки годности кандидатов в ФСО (таблица 3).

Таблица 3 – Константы инактивации при температуре хранения 4 °С и прогнозируемые сроки годности кандидатов в ФСО

Кандидат в ФСО	Среднее значение константы инактивации при 4°С, $(K_T \pm s) \times 10^{-5}$, сутки ⁻¹	Прогнозируемый срок годности, месяцев
1	1,96 ± 0,33	50
2	2,15 ± 0,30	46
3	3,74 ± 0,51	26
4	3,00 ± 0,39	33

Из данных таблицы 3 следует, что снижение специфической активности для кандидатов в ФСО 3 и 4 происходит более выражено, чем для кандидатов в ФСО 1 и 2. Значимость различий подтверждена с использованием *U*-критерия Манна – Уитни, который составил 0,032. Для кандидатов в ФСО с одинаковым составом стабилизаторов статистических отличий не выявлено ($p = 0,118$ для 1 и 2 вариантов ФСО; $p = 0,123$ – для 3 и 4).

В ходе исследования по выбору стабилизатора предпринята попытка оценить влияние концентрации белка на сохранность свойств кандидатов в ФСО, так как с увеличением этого показателя повышается число межбелковых контактов, что в итоге может приводить к денатурации и агрегации антител. Нами не выявлено значимых различий между кандидатами в ФСО с одинаковой защитной средой и содержанием белка, различающимся в 2 раза. По-видимому, изучаемые стабилизаторы эффективно экранируют молекулы IgG при разном уровне концентрации белка.

Тест термодеградации также позволил оценить стабильность ФСО при отклонении температурного режима хранения от регламентированного. Снижение концентрации IgG к вирусу КЭ кандидата в ФСО 1 на 210 сутки составило $(3,3 \pm 1,2)$ % при температуре 56 °С, $(2,2 \pm 2,0)$ % – при 45 °С, $(1,3 \pm 0,8)$ % – при 30 °С, что указывало на возможность временного отклонения условий хранения от установленных без потери специфической активности.

Таким образом, в результате ускоренных испытаний кандидатов в ФСО выбран двухкомпонентный наполнитель, содержащий глицин и *l*-пролин в конечных концентрациях по 12,5 г/л. Показана стабильность ФСО при временном повышении температуры хранения, что делает допустимым его транспортировку при температуре окружающей среды.

3.3 Получение и изучение свойств экспериментальных серий фармакопейного стандартного образца

Сырьем для получения экспериментальных серий ФСО явилась плазма крови доноров, иммунизированных вакциной КЭ культуральной очищенной инактивированной сухой концентрированной производства ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) согласно инструкции по применению, или полученная методом сплошного скрининга от доноров, проживающих на эндемичных по КЭ территориях. Производили три технологических загрузки. В первом производственном пуле содержание белка составило 48 г/л, титр антител к вирусу КЭ – 1:20, во втором – 53 г/л и 1:20, в третьем – 55 г/л и 1:40. Размороженную плазму фильтровали и перемещали в реактор. Основными стадиями очистки и выделения IgG к вирусу КЭ явились: удаление белковых компонентов свертывающей системы крови (фракция I), получение фракции II+III (A), отмывка фракции II+III и получение фракции A₁, двойное осаждение β-глобулинов и липоидов. Полученные супернатанты представляли собой фракцию γ-глобулинов, обогащенную IgG (более 95,2 %). Растворы осветляли, подвергали ультрафильтрации для удаления остаточного этанола (в режиме диафильтрации) и концентрировали. Вносили глицин и *l*-пролин до конечной концентрации каждого компонента 12,5 г/л, корректировали pH до 5,0 добавлением 0,1 М раствора соляной кислоты. В асептических условиях полученные концентраты подвергали стерилизующей фильтрации в промежуточную емкость. При постоянном перемешивании раствор разливали в

стерильные флаконы по 1,6 мл, визуально контролируя уровень жидкости в каждом флаконе. Затем образцы замораживали и лиофильно высушивали. Процесс лиофилизации представлен на рисунке 2. Объем каждой партии составил примерно 250 флаконов.

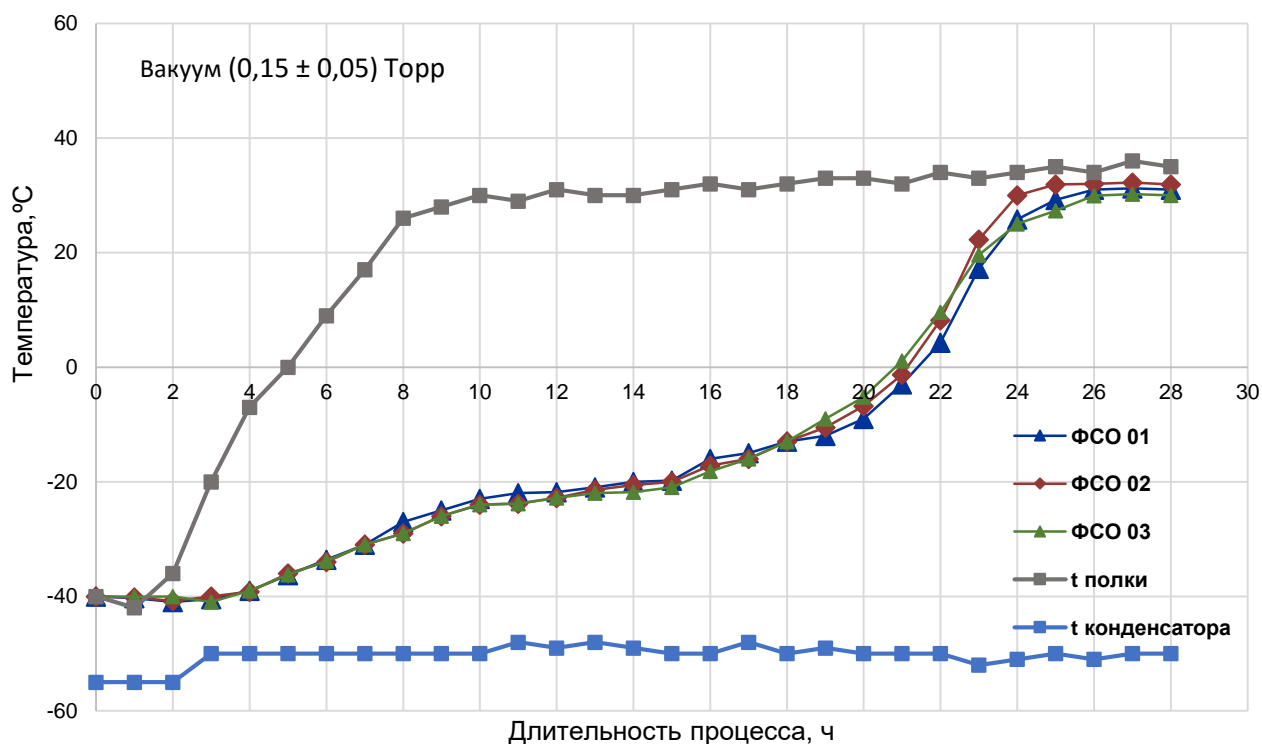


Рисунок 2 – График лиофилизации ФСО экспериментальных серий 01, 02 и 03

Экспериментальные серии ФСО исследованы согласно общепринятой практике по основным критериям качества иммуноглобулинов человека, за исключением показателей, которые определяют безопасность лекарственной формы препарата при его клиническом применении: пирогенности, аномальной токсичности, содержания анти-А и анти-В гемагглютинов, анти-Д антител и других. Требования к специфической активности, остаточной влажности, времени растворения, рН, содержанию белка, внутрисерийной однородности определены исходя из рекомендаций ВОЗ [211] и на основании результатов собственных исследований. Остальные показатели нормировали, руководствуясь Государственной Фармакопеей РФ [34]. Результаты испытаний представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты определения показателей качества ФСО

Наименование показателя качества	Экспериментальная серия			Нормативное значение показателя качества
	01	02	03	
Описание	Аморфная масса белого цвета			Аморфная масса белого цвета
Остаточная влажность (потеря в массе при высушивании), %	0,85	0,79	0,77	Не более 1 %
Время растворения, минут	5,0	5,0	4,5	Не более 15 минут
Прозрачность, ед. ОП	0,014	0,015	0,015	Не более 0,050
Цветность, ед. ОП	0,034	0,032	0,031	Не более 0,150
pH	5,04	5,02	5,02	5,0 ± 0,5
Содержание белка, г/л	64	73	76	Не нормируется
Электрофоретическая однородность, относительное содержание фракции γ -глобулинов, % от общего белка	95,3	95,2	97,5	Не менее 95 %
Молекулярные параметры, содержание фракции, %: ди- и мономеры полимеры и агрегаты фрагменты	97,8	97,4	97,0	Не менее 85 %
	0,5	0,5	0,8	Не более 10 %
	1,7	2,1	2,2	Не нормируется
Фракционный состав	Интенсивная линия преципитации IgG			Должна выявляться интенсивная линия преципитации IgG и не более четырех дополнительных линий
Стерильность	Стерилен			Должен быть стерильным
Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg)	Отсутствует			Должен отсутствовать
Антитела к вирусу гепатита С	Отсутствуют			Должны отсутствовать
Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген p24 ВИЧ-1	Отсутствуют			Должны отсутствовать
Специфическая активность (содержание антител к вирусу клещевого энцефалита) по данным РТГА	1:80	1:160	1:320	Содержание антител к вирусу клещевого энцефалита должно быть не менее 1:80
Точность розлива, %	0,8	1,0	1,0	Не выше 1 %

Как видно из данных, представленных в таблице 4, показатели качества трех экспериментальных серий ФСО соответствовали установленным требованиям. Образцы представляли собой аморфную массу белого цвета, равномерным слоем прилегающую к стенкам флакона (рисунок 3).

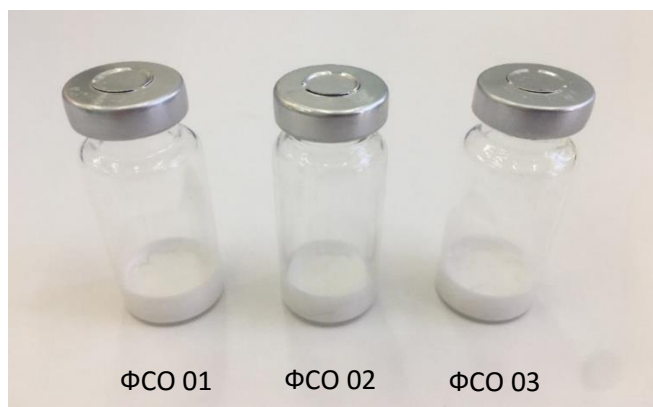
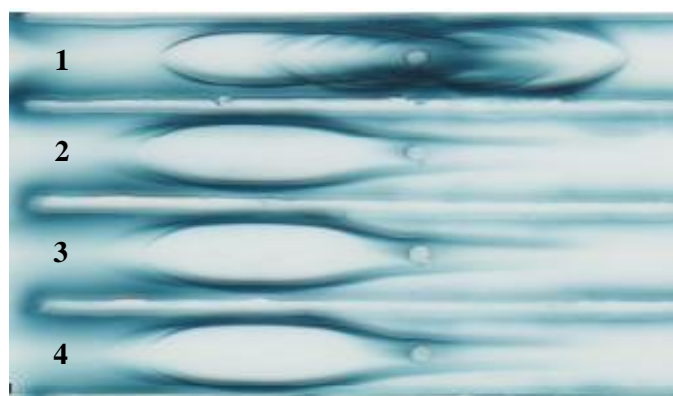


Рисунок 3 – ФСО экспериментальных серий 01, 02 и 03

Электрофоретическая однородность образцов от 95,2 % до 97,5 % свидетельствовала о том, что основную фракцию белка составлял γ -глобулин. На иммуноэлектрофореграмме выявлена расщепленная зона преципитации, локализация которой соответствовала IgG (рисунок 4).



Катод - справа, анод - слева. В траншеях антисыворотка кролика к белкам сыворотки крови человека. В лунках нормальная сыворотка крови человека (1); ФСО серии 01 (2); ФСО серии 02 (3); 4 – ФСО серии 03 (4).

Рисунок 4 – Иммуноэлектрофореграмма ФСО

Молекулярно-массовое распределение характеризовалось низким содержанием полимеров и агрегатов (до 0,8 %), а также фрагментов (до 2,2 %). Образцы были стерильны. Маркеры гемотрансмиссивных инфекций не выявлены. Специфическая активность по данным РТГА была не ниже титра антител 1:80. Различия в объеме наполнения флаконов не превышали 1 %, что указывало на воспроизводимость процесса дозирования.

Для оценки внутрисерийной однородности по содержанию антител к вирусу КЭ из каждой экспериментальной серии отобрано случайным образом по 20 флаконов,

проведены две аналитические серии испытаний методом ИФА в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов ВектоВКЭ-IgG. Статистической обработке подвергнуты значения ОП исследуемых образцов (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты оценки внутрисерийной однородности ФСО

№ образца, статистический параметр (формула расчета)	Значение ОП, полученное для ФСО экспериментальной серии					
	01		02		03	
	в аналитической серии испытаний					
	1	2	1	2	1	2
1	1,112	1,183	1,667	1,655	2,235	2,321
2	1,204	1,207	1,533	1,628	1,933	2,057
3	1,117	1,098	1,692	1,653	2,154	2,269
4	1,170	1,091	1,580	1,591	2,061	2,028
5	1,093	1,168	1,564	1,384	2,014	1,976
6	1,141	1,142	1,664	1,428	2,034	2,060
7	1,154	1,097	1,577	1,533	1,997	1,877
8	1,117	1,137	1,574	1,573	1,787	1,713
9	1,346	1,202	1,656	1,513	1,827	1,963
10	1,196	1,229	1,552	1,350	1,999	1,842
11	1,254	1,132	1,753	1,652	1,733	1,635
12	1,171	1,177	1,632	1,624	1,813	2,104
13	1,212	1,150	1,642	1,509	2,214	2,137
14	1,215	1,199	1,556	1,383	1,854	1,868
15	1,144	1,212	1,557	1,607	1,779	1,730
16	1,012	1,092	1,339	1,375	2,055	2,271
17	1,210	1,153	1,472	1,484	2,107	2,015
18	1,045	0,994	1,415	1,372	2,104	2,055
19	1,258	1,131	1,622	1,649	1,893	2,128
20	1,125	1,120	1,455	1,425	1,893	1,653
Среднее результатов измерений ОП \bar{X} (2.4)	1,155		1,547		1,980	
Сумма квадратов отклонений результата измерения от среднего в аналитической серии SS_e (2.6)	0,047		0,114		0,188	
Сумма квадратов отклонений среднего в аналитической серии от среднего всех результатов измерения ОП SS_H (2.7)	0,063		0,171		0,502	
Усредненная оценка \overline{SS}_e (2.8)	0,002		0,006		0,009	
Усредненная оценка \overline{SS}_H (2.9)	0,003		0,009		0,026	
Стандартная неопределенность от неоднородности u_h (2.10)	0,024		0,038		0,048	
Относительная неопределенность от неоднородности $u_{h\%}$ (2.12)	2,107		2,437		2,447	

Согласно данным, представленным в таблице 5, неопределенность от неоднородности ФСО в пределах одной серии варьировала от 2,107 % до 2,447 %, что указывало на гомогенность содержимого разных флаконов с ФСО. В результате экспериментально обосновано требование к показателю внутрисерийной однородности – неопределенность от неоднородности ФСО ($u_{h\%}$) не должна превышать 3 %.

Таким образом, по итогам проведенных исследований разработан способ получения ФСО, заключающийся в отборе субстанции (иммунной плазмы крови доноров), выделении фракции IgG методом этанольного фракционирования, концентрировании, внесении стабилизаторов глицина и *l*-пролина в количестве по 12,5 г/л, корректировке рН раствора иммуноглобулина до $5,0 \pm 0,5$, стерильном розливе во флаконы при постоянном перемешивании раствора и лиофилизации.

Результаты оценки свойств лиофилизатов антител трех экспериментальных серий явились основой для разработки нормативных требований к ФСО содержания антител IgG человека к вирусу КЭ.

ГЛАВА 4 АТТЕСТАЦИЯ ФАРМАКОПЕЙНОГО СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Аттестация – исследование, имеющее целью определение аттестуемой характеристики ФСО. Аттестуемая характеристика представлена в виде аттестованного значения (содержания антител к вирусу КЭ) и его неопределенности. ФСО аттестован с использованием методов РТГА и ИФА. Испытания проведены независимо специалистами двух лабораторий (ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России и ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) в регламентированных условиях с применением средств измерения сопоставимого уровня точности.

4.1 Определение аттестуемой характеристики фармакопейного стандартного образца в реакции торможения гемагглютинации

За аттестованное значение принята медиана титра антител к вирусу КЭ, за неопределенность аттестованного значения – доверительный интервал медианы, который рассчитывали по формулам (2.13) и (2.14). В трех сериях аттестационных испытаний исследовано по 15 образцов стандарта (8 – специалистами одной лаборатории, 7 – другой). Результаты аттестации экспериментальных серий представлены в таблице 6. Данные, полученные в двух лабораториях, являлись эквивалентными ($p > 0,05$), что позволило объединить их и рассчитать соответствующие статистические параметры. Для серии 02 границы доверительного интервала совпали со значением медианы выборки, поэтому неопределенность установили по минимальному и максимальному значениям титра антител.

Таблица 6 – Результаты аттестационных испытаний ФСО в реакции торможения гемагглютинации

№ аттестационного испытания	№ образца	Титр антител к вирусу КЭ в ФСО экспериментальной серии					
		01		02		03	
		лаборатория		лаборатория		лаборатория	
		1	2	1	2	1	2
1	1	1:160	1:80	1:160	1:80	1:320	1:320
	2	1:160	1:80	1:160	1:80	1:320	1:320
	3	1:80	1:80	1:160	1:160	1:320	1:320
	4	1:80	1:80	1:160	1:160	1:320	1:320
	5	1:80	1:80	1:160	1:160	1:160	1:160
	6	1:80	1:80	1:160	1:160	1:160	1:160
	7	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
	8	1:160	–	1:160	–	1:160	–
2	1	1:80	1:80	1:160	1:160	1:160	1:320
	2	1:80	1:80	1:160	1:160	1:320	1:320
	3	1:80	1:80	1:160	1:160	1:320	1:320
	4	1:160	1:80	1:160	1:160	1:320	1:320
	5	1:160	1:160	1:160	1:160	1:320	1:320
	6	1:80	1:80	1:160	1:160	1:320	1:320
	7	1:80	1:80	1:160	1:160	1:160	1:160
	8	1:160	–	1:160	–	1:160	–
3	1	1:160	1:80	1:160	1:160	1:320	1:320
	2	1:80	1:80	1:160	1:160	1:320	1:320
	3	1:80	1:80	1:160	1:160	1:320	1:320
	4	1:80	1:80	1:160	1:160	1:320	1:320
	5	1:80	1:80	1:160	1:160	1:320	1:320
	6	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
	7	1:160	1:160	1:80	1:160	1:160	1:160
	8	1:80	–	1:80	–	1:160	–
U-критерий Манна–Уитни (уровень значимости p)		195 ($p = 0,11$)		249 ($p = 0,91$)		219 ($p = 0,37$)	
Медиана, Me		1:80		1:160		1:320	
Номер порядковой статистики k ($n = 45, P = 95 \%$)		16		16		16	
Границы доверительного интервала		от 1:80 до 1:160		совпадают со значением Me		от 1:160 до 1:320	

Аттестуемые характеристики ФСО экспериментальных серий 01, 02 и 03 составили 1:80 [1:80 – 1:160], 1:160 [1:80 – 1:160], 1:320 [1:160 – 1:320] соответственно.

4.2 Определение аттестуемой характеристики фармакопейного стандартного образца в иммуноферментном анализе

В международной практике для впервые утверждаемых стандартов (первичных) активность присваивают коллегиальным решением экспертов Национального института по биологической стандартизации и контролю (NIBSC, Великобритания). В отличие от международных стандартных образцов, для которых устанавливают только содержание основного компонента (аттестованное значение), отечественная нормативная база предусматривает необходимость оценки его неопределенности (погрешности). Для ФСО содержания антител IgG человека к вирусу КЭ, который разрабатывается впервые, принято решение аттестуемую характеристику установить исходя из величины титра вируснейтрализующих антител, полученной в ходе его аттестации методом РН на культуре клеток СПЭВ. Результаты биологической стандартизации ФСО были предоставлены Э.Ю. Кудашевой (д.м.н., начальник лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России). Согласно данным этих исследований титр вируснейтрализующих антител в стандарте составил 1:200 [41]. Для оценки неопределенности аттестованного значения предложен алгоритм, который включал в себя:

- построение калибровочных кривых по средним значениям ОП, полученным для четырех последовательных разведений ФСО;
- проверку линейности (условия $R^2 > 0,95$) и адекватности функций калибровки;
- расчет коэффициентов активности и определение стандартного отклонения полученных значений.

Для его реализации специалистом одной лаборатории выполнено три серии аттестационных испытаний 8 образцов стандарта в разведениях 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000 с использованием наборов реагентов ВектоВКЭ-IgG, специалистом другой – протестирован ФСО в разведениях 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 с применением набора реагентов ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG и в разведениях 1:500,

1:1000, 1:2000, 1:4000 с использованием тест-системы Anti-TBE Virus ELISA (IgG).

Полученные результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Значения оптической плотности в разведениях ФСО в ходе его аттестационных испытаний

№ аттестационного испытания	Разведение образца	Значение ОП, № исследуемого образца стандарта								Значение p для W - критерия Шапиро – Уилка
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Результаты лаборатории 1 (тест-система ВектоВКЭ-IgG) (n = 96)										
1	1:2000	0,680	0,580	0,550	0,498	0,581	0,562	0,595	0,572	0,31
	1:4000	0,388	0,319	0,325	0,293	0,347	0,323	0,363	0,352	0,95
	1:8000	0,219	0,193	0,188	0,172	0,200	0,193	0,212	0,215	0,69
	1:16000	0,146	0,131	0,126	0,118	0,143	0,145	0,150	0,159	0,77
2	1:2000	0,567	0,511	0,565	0,556	0,555	0,606	0,573	0,572	0,27
	1:4000	0,341	0,279	0,332	0,268	0,312	0,317	0,332	0,329	0,11
	1:8000	0,185	0,174	0,185	0,165	0,186	0,189	0,198	0,195	0,51
	1:16000	0,124	0,125	0,136	0,122	0,130	0,138	0,133	0,141	0,63
3	1:2000	0,767*	0,644	0,697	0,665	0,645	0,677	0,677	0,656	0,04/0,61*
	1:4000	0,425	0,368	0,393	0,375	0,383	0,382	0,403	0,380	0,31
	1:8000	0,243	0,211	0,189	0,220	0,228	0,233	0,245	0,218	0,68
	1:16000	0,150	0,139	0,152	0,144	0,146	0,157	0,163	0,156	0,99
Результаты лаборатории 2 (тест-система ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IgG) (n = 96)										
1	1:400	1,441	1,433	1,456	1,402	1,501	1,489	1,403	1,446	0,55
	1:800	0,534	0,511	0,536	0,525	0,574	0,524	0,563	0,611	0,28
	1:1600	0,143	0,149	0,136	0,156	0,128	0,154	0,152	0,178	0,75
	1:3200	0,011	0,011	0,012	0,015	0,013	0,016	0,012	0,017	0,55
2	1:400	2,544	2,600	1,907	1,906	2,127	1,992	2,46	2,294	0,25
	1:800	1,279	1,220	0,840	0,818	1,072	0,847	1,021	1,079	0,32
	1:1600	0,504	0,461	0,252	0,249	0,369	0,247	0,364	0,344	0,23
	1:3200	0,127	0,110	0,021	0,033	0,072	0,028	0,105	0,059	0,37
3	1:400	1,285	1,309	1,427	1,350	1,284	1,380	1,360	1,364	0,57
	1:800	0,498	0,521	0,445	0,371	0,463	0,402	0,376	0,363	0,35
	1:1600	0,118	0,153	0,068	0,048	0,089	0,107	0,112	0,108	0,83
	1:3200	0,008	0,013	0,009	0,008	0,010	0,008	0,010	0,012	0,18
Результаты лаборатории 2 (тест-система Anti-TBE Virus ELISA (IgG)) (n = 96)										
1	1:500	0,448	0,431	0,434	0,398	0,470	0,464	0,498	0,488	0,93
	1:1000	0,191	0,194	0,206	0,191	0,299	0,259	0,255	0,277	0,12
	1:2000	0,103	0,116	0,097	0,099	0,107	0,106	0,104	0,104	0,44
	1:4000	0,051	0,052	0,055	0,057	0,053	0,056	0,048	0,039	0,12
2	1:500	0,523	0,594	0,560	0,525	0,526	0,512	0,540	0,501	0,31
	1:1000	0,230	0,291	0,313	0,265	0,266	0,256	0,242	0,244	0,59
	1:2000	0,188	0,158	0,140	0,127	0,141	0,141	0,119	0,123	0,17
	1:4000	0,088	0,074	0,086	0,075	0,075	0,075	0,064	0,080	0,42
3	1:500	0,248	0,250	0,254	0,236	0,290	0,254	0,294	0,305	0,13
	1:1000	0,106	0,107	0,118	0,108	0,147	0,127	0,147	0,140	0,11
	1:2000	0,050	0,049	0,061	0,058	0,076	0,066	0,077	0,071	0,48
	1:4000	0,029	0,026	0,032	0,034	0,041	0,031	0,042	0,038	0,72
* Исключение значения 0,767 позволило привести характер распределения значений оптической плотности к нормальному.										

Поскольку для построения функции калибровки и оценки ее адекватности используются методы параметрической статистики, важно было установить нормальность распределения значений ОП в изучаемых выборках. Согласно данным таблицы 7, в третьей серии аттестационных испытаний ФСО в разведении 1:2000, выполненных лабораторией 1, распределение данных отличалось от нормального. Исключение точки экстремума (0,767) позволило привести характер распределения признака в выборке к нормальному ($p = 0,61$).

Для упрощения уравнений калибровки разведения ФСО преобразованы в коэффициенты 1, 0,5, 0,25, 0,125 с учетом кратности разбавления образцов, равной 2. Параметры функций калибровки и их статистическая значимость представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты оценки параметров функций калибровки

Параметр	Значение параметра (уровень p) в аттестационном исследовании №		
	1	2	3
Лаборатория 1, тест-система ВектоВКЭ-IgG			
Коэффициент детерминации R^2	0,999 ($p = 0,0005$)	1,000 ($p = 0,0002$)	1,000 ($p = 0,0004$)
Угловой коэффициент b	1,99 ($p = 0,0005$)	2,01 ($p = 0,0002$)	1,65 ($p = 0,0004$)
Свободный член уравнения a	-0,15 ($p = 0,01$)	-0,13 ($p = 0,005$)	-0,13 ($p = 0,01$)
Лаборатория 2, тест-система ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG			
Коэффициент детерминации R^2	0,996 ($p = 0,002$)	0,999 ($p = 0,0003$)	0,985 ($p = 0,007$)
Угловой коэффициент b	0,60 ($p = 0,002$)	0,40 ($p = 0,0003$)	0,63 ($p = 0,007$)
Свободный член уравнения a	0,15 ($p = 0,02$)	0,10 ($p = 0,007$)	0,17 ($p = 0,047$)
Лаборатория 2, тест-система Anti-TBE Virus ELISA (IgG)			
Коэффициент детерминации R^2	0,999 ($p = 0,0006$)	0,999 ($p = 0,0003$)	0,998 ($p = 0,0008$)
Угловой коэффициент b	2,16 ($p = 0,0006$)	1,91 ($p = 0,0003$)	3,74 ($p = 0,0008$)
Свободный член уравнения a	0,01 ($p = 0,42^*$)	-0,02 ($p = 0,23^*$)	0,01 ($p = 0,56^*$)
* Отсутствие значимости свободного члена уравнения a [62].			

В результате анализа данных таблицы 8 установлено, что функции калибровки имеют выраженный линейный характер, так как значения коэффициентов детерминации близки к 1 ($R^2 > 0,98$). Свободные члены a калибровочных функций, полученных при использовании тест-системы Anti-TBE Virus ELISA (IgG), являлись не значимыми ($p > 0,05$), поэтому были исключены из уравнений. В дальнейших расчетах использованы скорректированные зависимости. Затем проведена оценка адекватности функций калибровки. Результаты расчета параметров дисперсионного анализа представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты расчета параметров дисперсионного анализа при оценке адекватности функций калибровки

Параметр (формула расчета)	Лаборатория 1, тест-система ВектоВКЭ- IgG			Лаборатория 2, тест-система					
				ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ- IGG			Anti-TBE Virus ELISA (IgG)		
	№ аттестационного испытания								
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
SSE (2.17)	0,0280	0,0110	0,0170	0,0600	0,8760	0,183	0,0230	0,0190	0,0090
SSP (2.18)	0,0300	0,0100	0,0200	0,0200	0,8600	0,050	0,0200	0,0200	0,0100
SST (2.19)	0,9350	0,9430	1,0050	10,029	23,049	8,974	0,7920	0,9990	0,2500
SSR (2.20)	0,9070	0,9320	0,9880	9,9690	22,173	8,791	0,7690	0,9800	0,2410
s_e^2 (2.21)	0,0010	0,0004	0,0006	0,0020	0,0292	0,006	0,0010	0,0006	0,0003
s_{Δ}^2 (2.22)	0,0002	0,0000	0,0002	0,0070	0,0020	0,022	0,0004	0,0005	0,0001
s_p^2 (2.23)	0,0011	0,0005	0,0007	0,0010	0,0360	0,002	0,0009	0,0006	0,0003
$F_{\text{калибр.}}$ (2.24)	0,1430	0,1092	0,2469	9,2309	0,0540	10,55	0,4055	0,8578	0,3424
$F_{\text{табл.}}$ (95, 6, 24)	3,84								

Из представленных в таблице 9 данных следует, что уравнения функции калибровки, полученные в трех аттестационных испытаниях при использовании тест-систем ВектоВКЭ-IgG и Anti-TBE Virus ELISA (IgG) и во втором аттестационном испытании при использовании тест-системы ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG, отвечают условию $F_{\text{калибр.}} \leq F_{\text{табл.}}$ и могут быть применены для расчета содержания IgG к вирусу КЭ с целью определения аттестуемой характеристики ФСО.

Уравнения функции калибровки, полученные в аттестационных испытаниях 1 и 3 при использовании тест-системы ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG, не отвечают условию $F_{\text{калибр.}} \leq F_{\text{табл.}}$. На наш взгляд, значения ОП в разведении 1:3200 были слишком низкими и, вероятно, находились вне области прямой пропорциональности кривой ИФА, поэтому указанные величины исключены, коэффициенты уравнения калибровки и параметры дисперсионного анализа пересчитаны по трем координатам (таблица 10).

Таблица 10 – Результаты анализа адекватности скорректированных функций калибровки, полученных в аттестационных испытаниях 1 и 3 с использованием тест-системы ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG

Параметр анализа	Значение параметра (уровень p), полученное в аттестационном исследовании №	
	1	3
R^2	0,999 ($p = 0,019$)	0,994 ($p = 0,048$)
b	0,57 ($p = 0,019$)	0,59 ($p = 0,048$)
a	0,17 ($p = 0,046$)	0,21 ($p = 0,008$)
$F_{\text{калибр.}}$	1,35	2,98
$F(95; 6; 16)$	3,92	

Как видно из данных, приведенных в таблице 10, скорректированные функции калибровки линейны и удовлетворяют условию $F_{\text{калибр.}} \leq F_{\text{табл.}}$. Далее для каждого результата измерения ОП рассчитаны коэффициенты активности с учетом разведения ФСО. Вычисленные значения приведены в таблице 11.

Поскольку дисперсии выборок s_1^2 , s_2^2 , s_3^2 различались ($p = 0,002$, *Levene test*), сравнение групп проведено с использованием непараметрического критерия Краскела – Уоллиса. Рассчитанное значение p составило 0,70, что указывало на статистическую эквивалентность коэффициентов активности, полученных в двух лабораториях с применением разных диагностических наборов.

Результаты объединили ($n = 272$). Распределение признака в общей выборке было близко к нормальному ($p = 0,24$). Среднее значение коэффициентов активности \bar{k}_a объединенных данных, равное 1,0, указывало на правильность выбранной математической модели определения аттестуемой характеристики ФСО. Стандартное отклонение s составило 0,12.

Таблица 11 – Значения коэффициентов активности, полученные в аттестационных испытаниях ФСО экспериментальной серии 01 лабораториями 1 и 2

Лаборатория 1 ВектоВКЭ-IgG (n = 96)			Лаборатория 2 ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG (n = 80)			Лаборатория 2 Anti-TBE Virus ELISA (IgG) (n = 96)		
1	2	3	1	2	3	1	2	3
1,2	1,0	1,1	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	0,9
1,2	1,1	1,2	1,0	1,2	1,0	0,8	0,9	0,8
1,1	1,0	1,1	1,0	1,2	1,1	0,9	1,4	0,8
1,1	1,0	1,0	1,0	1,2	1,0	0,9	1,3	0,9
1,0	0,9	0,9	0,9	1,1	1,0	0,9	1,1	0,9
1,0	0,9	1,0	1,0	1,2	1,2	0,8	1,1	0,8
0,9	0,9	0,9	1,0	1,1	1,1	1,0	1,2	0,7
0,9	1,0	0,8	1,0	1,1	1,0	0,9	1,1	0,8
0,9	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	0,9	1,1	1,0
1,0	1,1	1,0	1,0	0,9	1,0	0,9	1,2	0,9
0,9	1,0	0,7	0,9	0,8	0,9	0,8	1,1	0,9
0,8	1,1	1,0	1,0	0,9	1,0	1,0	1,3	1,0
0,8	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	0,9	1,0	0,9
0,9	0,8	1,0	1,0	0,9	1,0	0,8	1,0	0,8
0,8	0,8	1,0	1,0	0,8	1,1	0,9	1,0	0,9
0,6	0,9	0,9	1,0	0,9	1,0	1,0	1,1	1,0
1,0	1,0	0,9	0,9	1,0	0,9	1,0	1,0	1,1
1,1	1,0	1,0	1,0	1,1	1,1	1,3	1,0	1,1
1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,1	1,1
1,0	1,1	0,9	1,0	1,0	0,9	0,9	1,1	1,2
1,0	1,1	1,0	1,0	0,9	1,1	1,0	1,0	1,0
1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	1,1	1,0	1,0
0,9	1,0	1,0	1,0	0,8	0,9	0,9	1,1	1,0
1,1	1,2	1,1	1,1	0,9	1,1	1,0	1,1	0,9
1,0	1,0	1,0	—*	1,1	—*	1,1	1,0	1,1
1,1	1,1	1,1	—*	1,0	—*	1,1	0,9	1,1
1,1	1,1	1,1	—*	1,0	—*	0,9	0,9	1,2
1,2	1,1	1,1	—*	1,1	—*	0,8	1,0	1,3
1,0	1,0	1,0	—*	1,0	—*	1,1	1,0	1,1
1,1	1,1	1,0	—*	1,1	—*	1,2	0,9	1,1
1,1	1,0	0,9	—*	1,0	—*	0,9	0,9	1,1
1,3	1,2	1,0	—*	1,0	—*	0,7	1,2	1,1
$\bar{X}_1 = 0,9989$ $s_1^2 = 0,0122$			$\bar{X}_2 = 1,0024$ $s_2^2 = 0,0097$			$\bar{X}_3 = 0,9985$ $s_3^2 = 0,0200$		
* Значения не рассчитывались, так как соответствующие им ОП были исключены при построении функции калибровки из-за несоблюдения условия $F_{\text{калибр.}} < F(P; n - 2; mn - n)$. \bar{X} – значение среднего арифметического; s^2 – значение дисперсии.								

Согласно общепринятой практике при аттестации биологических ФСО неопределенность аттестованного значения установлена по двум стандартным отклонениям [8, 94]. Интервал, равный $\pm 2s$, охватил диапазон от 0,76 до 1,24. Обратное значение титра антител, полученное при биологической стандартизации ФСО, принято за нижнюю границу неопределенности аттестованного значения, которой соответствовал коэффициент 0,76. Затем рассчитаны аттестованное значение и его верхняя граница (таблица 12).

Таблица 12 – Результаты определения аттестуемой характеристики ФСО экспериментальной серии 01 в иммуноферментном анализе

Аттестуемая характеристика	Относительное значение	Абсолютное значение, ЕД/мл
Нижняя граница неопределенности аттестованного значения	0,76	200
Аттестованное значение	1,00	248
Верхняя граница неопределенности аттестованного значения	1,24	296

Таким образом, аттестованное значение ФСО первого выпуска составило 248 ЕД/мл, неопределенность аттестованного значения – от 200 до 296 ЕД/мл.

Далее проведена аттестация повторных выпусков ФСО экспериментальных серий 02 и 03 относительно ФСО экспериментальной серии 01. Содержание IgG к вирусу КЭ рассчитано методом параллельных линий при условии значимости параметров дисперсионного анализа при доверительной вероятности $P = 95\%$ (таблица 13).

Статическая эквивалентность результатов ИФА, полученных с использованием разных наборов реагентов, подтверждена в однофакторном дисперсионном анализе ($p_{02} = 0,90$; $p_{03} = 0,12$). Это позволило объединить данные и рассчитать аттестуемые характеристики, которые составили (297 ± 61) ЕД/мл для экспериментальной серии 02 и (360 ± 75) ЕД/мл для экспериментальной серии 03.

Таблица 13 – Результаты аттестационных исследований ФСО экспериментальных серий 02 и 03

Содержание IgG к вирусу КЭ (ЕД/мл) в ФСО экспериментальной серии ..., полученное с использованием тест-системы					
02 (n = 72)			03 (n = 72)		
ВБ	ДС	ЕИ	ВБ	ДС	ЕИ
254	311	334	317	334	342
258	267	279	349	412	310
260	315	306	378	347	430
264	342	239	423	387	316
271	260	272	332	304	321
274	273	235	335	339	325
279	265	266	346	383	326
281	322	356	416	311	330
285	255	287	404	302	328
286	254	264	408	334	331
289	286	288	389	406	379
295	342	319	426	336	340
297	290	291	300	349	308
299	284	346	375	347	345
309	314	287	400	333	354
320	347	323	358	393	420
249	342	264	285	367	361
322	259	323	361	400	374
327	304	283	355	362	333
327	272	293	401	324	386
334	281	305	386	351	393
341	349	280	420	440	396
321	302	336	403	337	358
349	280	320	363	334	311
$\bar{X} = 300$ $s = 30$	$\bar{X} = 297$ $s = 32$	$\bar{X} = 296$ $s = 32$	$\bar{X} = 372$ $s = 39$	$\bar{X} = 356$ $s = 36$	$\bar{X} = 351$ $s = 35$

Примечание – ДС – ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG; ВБ – ВектоВКЭ-IgG; ЕИ – Anti-TBE Virus ELISA. \bar{X} – значение среднего арифметического; s – значение стандартного отклонения.

Таким образом, на основании проведенных исследований разработан алгоритм оценки аттестуемой характеристики первичного ФСО методом ИФА, заключающийся в построение калибровочных кривых по средним значениям ОП, полученным для четырех последовательных разведений стандарта; проверке линейности (условия $R^2 > 0,95$) и адекватности функций калибровки; расчете коэффициентов активности ФСО и определении стандартного отклонения полученных значений. За нижнюю границу неопределенности аттестованного значения принята обратная величина титра вируснейтрализующих антител, установленная в результате биологической стандартизации ФСО. Аттестованное

значение и верхняя граница неопределенности рассчитаны с учетом 2s. По результатам аттестационных испытаний установлены аттестуемые характеристики трех экспериментальных серий ФСО методами РТГА и ИФА (таблица 14).

Таблица 14 – Результаты межлабораторной аттестации ФСО

Экспериментальная серия ФСО	Аттестуемая характеристика в РТГА	Аттестуемая характеристика в ИФА, ЕД/мл
01	1:80 [1:80 – 1:160]	248 [200 – 296]
02	1:160 [1:80 – 1:160]	297 [236 – 358]
03	1:320 [1:160 – 1:320]	360 [285 – 435]

4.3 Анализ стабильности фармакопейного стандартного образца и установление срока годности

С целью определения срока годности оценена долгосрочная стабильность ФСО, хранившегося при температуре от 2 до 8 °С, методами РТГА и ИФА. Контроль проводили с периодичностью 6 месяцев. Для исследования отбирали по 5 образцов стандарта. На текущий момент исследования продолжительность хранения ФСО серии 01 составила 48 месяцев, серии 02 – 42 месяца, серии 03 – 36 месяцев. Результаты оценки стабильности ФСО по данным РТГА представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Результаты оценки стабильности ФСО по данным реакции торможения гемагглютинации

Номер экспериментальной серии ФСО, оцениваемый параметр	Титр антител к вирусу КЭ при хранении в течение (...) месяцев								
	Исх.	6	12	18	24	30	36	42	48
01	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:160	1:80
	1:80	1:80	1:160	1:80	1:80	1:160	1:80	1:80	1:80
	1:80	1:80	1:80	1:160	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
	1:80	1:80	1:80	1:160	1:80	1:80	1:160	1:80	1:80
	1:160	1:160	1:80	1:80	1:80	1:160	1:80	1:80	1:80

Продолжение таблицы 15

Номер экспериментальной серии ФСО, оцениваемый параметр	Титр антител к вирусу КЭ при хранении в течение (...) месяцев									
	Исх.	6	12	18	24	30	36	42	48	
Медиана, <i>Me</i>	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	
Среднее геометрическое, <i>Ge</i>	1:92	1:92	1:92	1:106	1:80	1:106	1:92	1:92	1:80	
Критерий Краскела – Уоллиса	0,011 ($p = 0,95$)									
02	1:160 1:160 1:160 1:160 1:160	1:160 1:160 1:160 1:160 1:320	1:160 1:80 1:160 1:160 1:160	1:160 1:160 1:160 1:80 1:160	1:80 1:160 1:160 1:160 1:160	1:80 1:160 1:160 1:160 1:160	1:160 1:160 1:80 1:160 1:160	1:160 1:160 1:160 1:160 1:320	–	–
Медиана, <i>Me</i>	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	–	
Среднее геометрическое, <i>Ge</i>	1:160	1:184	1:139	1:139	1:139	1:139	1:139	1:184	–	
Критерий Краскела – Уоллиса	6,60 ($p = 0,47$)									
03	1:320 1:320 1:320 1:320 1:160	1:320 1:320 1:320 1:160 1:320	1:160 1:320 1:160 1:320 1:320	1:320 1:320 1:320 1:320 1:320	1:160 1:320 1:320 1:320 1:160	1:320 1:320 1:320 1:320 1:160	1:160 1:320 1:320 1:320 1:160	–	–	–
Медиана, <i>Me</i>	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	–	–	
Среднее геометрическое, <i>Ge</i>	1:279	1:279	1:243	1:320	1:243	1:279	1:243	–	–	
Критерий Краскела – Уоллиса	3,30 ($p = 0,66$)									

Медианы специфической активности трех экспериментальных серий не менялись и составляли 1:80, 1:160 и 1:320. Для того, чтобы отразить вклад единичных определений содержания антител, вычислены величины среднего геометрического титра и построена гистограмма динамики специфической активности ФСО (рисунок 5). В соответствии с графическими данными, тенденции снижения содержания антител не наблюдалось. Отсутствие изменения специфической активности на протяжении срока хранения подтверждено статистически ($p > 0,05$ для критерия Краскела – Уоллиса).

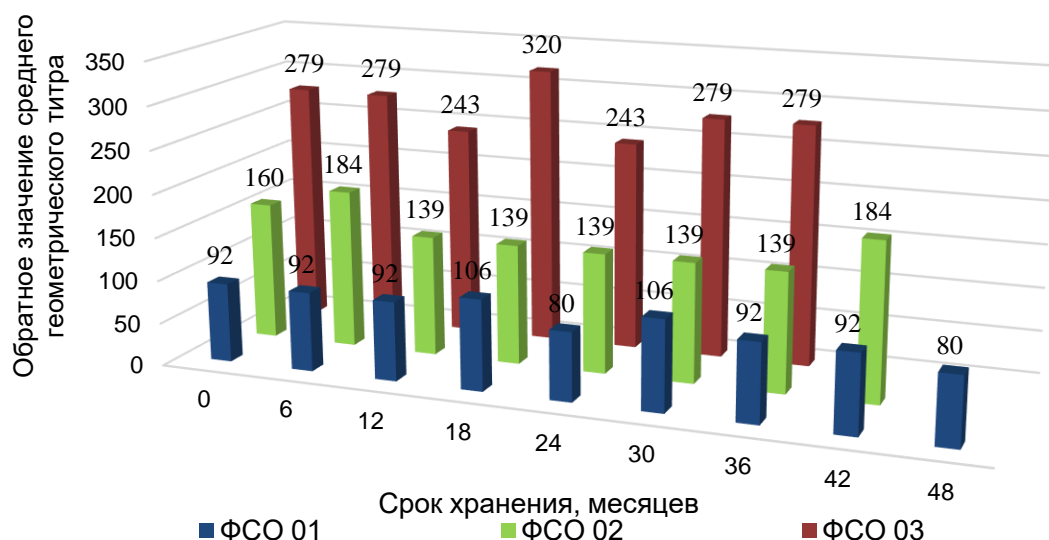


Рисунок 5 – Динамика специфической активности ФСО трех экспериментальных серий по данным реакции торможения гемагглютинации

В ИФА стабильность серии 01 оценена относительно образцов этой же серии ФСО, хранившихся при температуре минус 80 °С (базовая линия) [151]. Содержание IgG к вирусу КЭ в экспериментальных сериях 02 и 03 определено относительно ФСО серии 01. Результаты ИФА обработаны методом параллельных линий. Специфическая активность выражена в % относительно соответствующего аттестованного значения. За минимальную величину принята нижняя граница неопределенности – 80 %. Результаты мониторинга стабильности по данным ИФА представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Результаты оценки стабильности ФСО по данным иммуноферментного анализа

Номер экспериментальной серии ФСО, оцениваемый параметр	Относительное содержание IgG к вирусу КЭ (%) в период наблюдения (...) месяцев							
	6	12	18	24	30	36	42	48
01	111	82	95	102	94	89	102	98
	98	91	105	93	100	90	89	100
	84	100	113	102	88	100	90	102
	97	92	101	100	100	105	101	90
	110	98	107	116	98	115	101	95
Среднее геометрическое, G_e	100	92	104	102	96	99	96	97
Коэффициент корреляции Спирмена, r_s	-0,21							
Критерий Краскела – Уоллиса (значимость различий)	8,75 ($p = 0,27$)							

Продолжение таблицы 16

Номер экспериментальной серии ФСО, оцениваемый параметр	Относительное содержание IgG к вирусу КЭ (%) в период наблюдения (...) месяцев							
	6	12	18	24	30	36	42	48
02	86	97	99	100	110	108	110	
	89	100	87	118	92	110	95	
	94	110	91	88	99	89	94	–
	101	115	96	108	108	100	104	
	108	108	113	118	113	104	110	
Среднее геометрическое, Ge	95	106	97	106	104	102	102	–
Коэффициент корреляции Спирмена, r_s	0,14							
Критерий Краскела – Уоллиса (значимость различий)	6,41 ($p = 0,38$)							
03	99	101	103	88	101	98		
	107	110	99	88	101	100		
	110	95	119	107	96	97	–	–
	89	110	97	84	114	101		
	92	111	99	104	117	110		
Среднее геометрическое, Ge	99	105	103	94	106	101	–	–
Коэффициент корреляции Спирмена, r_s	0,30							
Критерий Краскела – Уоллиса (значимость различий)	4,50 ($p = 0,34$)							

Как видно из данных таблицы 16, в период наблюдения минимальное значение содержания IgG к вирусу КЭ в ФСО составило 92 % и находилось в диапазоне неопределенности аттестованного значения. В результате анализа корреляции концентрации антител и продолжительности хранения экспериментальных серий установлено отсутствие устойчивых трендов изменения содержания IgG к вирусу КЭ ($r_{s01} = -0,21$, $r_{s02} = 0,14$, $r_{s03} = 0,30$). Постоянство специфической активности подтверждено статистической эквивалентностью результатов, полученных в разные периоды наблюдения на протяжении хранения ($p_{01} = 0,27$, $p_{02} = 0,38$, $p_{03} = 0,34$).

Поскольку для установления срока годности ФСО необходимо доказать сохранность специфической активности по результатам исследования трех экспериментальных серий, сделан вывод о его стабильности в течение 3 лет при температуре хранения от 2 до 8 °С с возможностью продления срока годности по данным дальнейшего мониторинга стабильности.

ГЛАВА 5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФАРМАКОПЕЙНОГО СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА

5.1 Совершенствование методики определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита на основе реакции торможения гемагглютинации

Методика определения специфической активности на основе РТГА модифицирована в части обработки результатов реакции. Полученный в постановке анализа титр антител в исследуемом образце скорректирован с учетом коэффициента пересчета k – поправки на ошибку методики, который рассчитывали как отношение фактического титра антител в ФСО к аттестованному значению:

$$k = \frac{A_{\text{ФСО}}}{T_{\text{ФСО}}} \quad (5.1)$$

где k – коэффициент пересчета;
 $A_{\text{ФСО}}$ – аттестованное значение ФСО;
 $T_{\text{ФСО}}$ – фактическое значение титра антител в ФСО.

Специфическую активность исследуемого образца вычисляли по следующей формуле:

$$T = k \cdot T_{\text{обр}} \quad (5.2)$$

где T – скорректированное значение титра антител в исследуемом образце;
 k – поправка на ошибку методики РТГА;
 $T_{\text{обр}}$ – фактическое значение титра антител в исследуемом образце.

Далее осуществлена проверка предложенного алгоритма. Для этого с использованием ФСО определена специфическая активность коммерческих серий иммуноглобулина человека против КЭ производства АО НПО «Микроген» филиал г. Томск (образцы 1, 2), филиал г. Пермь (образец 3), ГБУЗ «ЧОСПК» (образцы 4,

5, 6), ГБУЗ СО «ОСПК» (образцы 7, 8, 9). Согласно паспортным данным образцы 5 и 6 имели специфическую активность 1:320, остальные – 1:160. Проведено по три испытания специалистами двух лабораторий. ФСО и иммуноглобулины подвергали одинаковой пробоподготовке. Данные исследования учитывали при условии нахождения фактического титра антител в ФСО в интервале неопределенности аттестованного значения. Результаты оценки специфической активности с использованием ФСО представлены в таблице 17.

Согласно данным таблицы 17, фактический титр антител в ФСО в трех из шести постановок отличался от аттестованного значения на шаг разведения. При сравнении результатов реакции, полученных разными специалистами, установлены значимые различия ($p = 0,022$ для U -критерия Манна – Уитни). После пересчета значений титра антител по отношению к аттестованному значению ФСО с использованием формул (5.1) и (5.2) была достигнута их статистическая эквивалентность ($p = 0,99$). Размах варьирования фактических данных, полученных для одноименных образцов препаратов, находился в пределах шага титрования, в то время как для скорректированных – отсутствовал, что указывает на повышение точности определения титра антител при использовании ФСО.

Поскольку РТГА на протяжении длительного времени применяют в контроле иммуноглобулина человека против КЭ, используемый набор реагентов верифицирован для исследования образцов препаратов крови, специфичность анализа доказана [41], дальнейшее экспериментальное обоснование модификации метода выполнено без проведения дополнительных испытаний. Валидационные характеристики прецизионность и правильность оценены на основании данных, представленных в таблице 17, согласно которым вариабельность результатов характеризовалась отсутствием разброса значений титра антител ($n = 27$) для одноименных образцов. Данные анализа признаны правильными, поскольку экспериментально полученное содержание антител к вирусу КЭ в ФСО находилось в пределах неопределенности аттестованного значения – от 1:80 до 1:160 ($n = 6$).

Таблица 17 – Результаты определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита на основе метода реакции торможения гемагглютинации с использованием ФСО

№ образца	Результаты специалиста 1						Результаты специалиста 2					
	Испытание 1		Испытание 2		Испытание 3		Испытание 1		Испытание 2		Испытание 3	
	Фактическое значение титра, $T_{обр}$	Скорректированное значение титра, T	Фактическое значение титра, $T_{обр}$	Скорректированное значение титра, T	Фактическое значение титра, $T_{обр}$	Скорректированное значение титра, T	Фактическое значение титра, $T_{обр}$	Скорректированное значение титра, T	Фактическое значение титра, $T_{обр}$	Скорректированное значение титра, T	Фактическое значение титра, $T_{обр}$	Скорректированное значение титра, T
1	1:320	1:160	1:320	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
2	1:320	1:160	1:320	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
3	1:320	1:160	1:320	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
4	1:320	1:160	1:320	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
5	1:640	1:320	1:640	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320
6	1:640	1:320	1:640	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320
7	1:320	1:160	1:320	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
8	1:320	1:160	1:320	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
9	1:320	1:160	1:320	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
ФСО	1:160 $k = 2$		1:160 $k = 2$		1:80 $k = 1$		1:80 $k = 1$		1:80 $k = 1$		1:160 $k = 2$	

5.2 Разработка методики определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита на основе иммуноферментного анализа

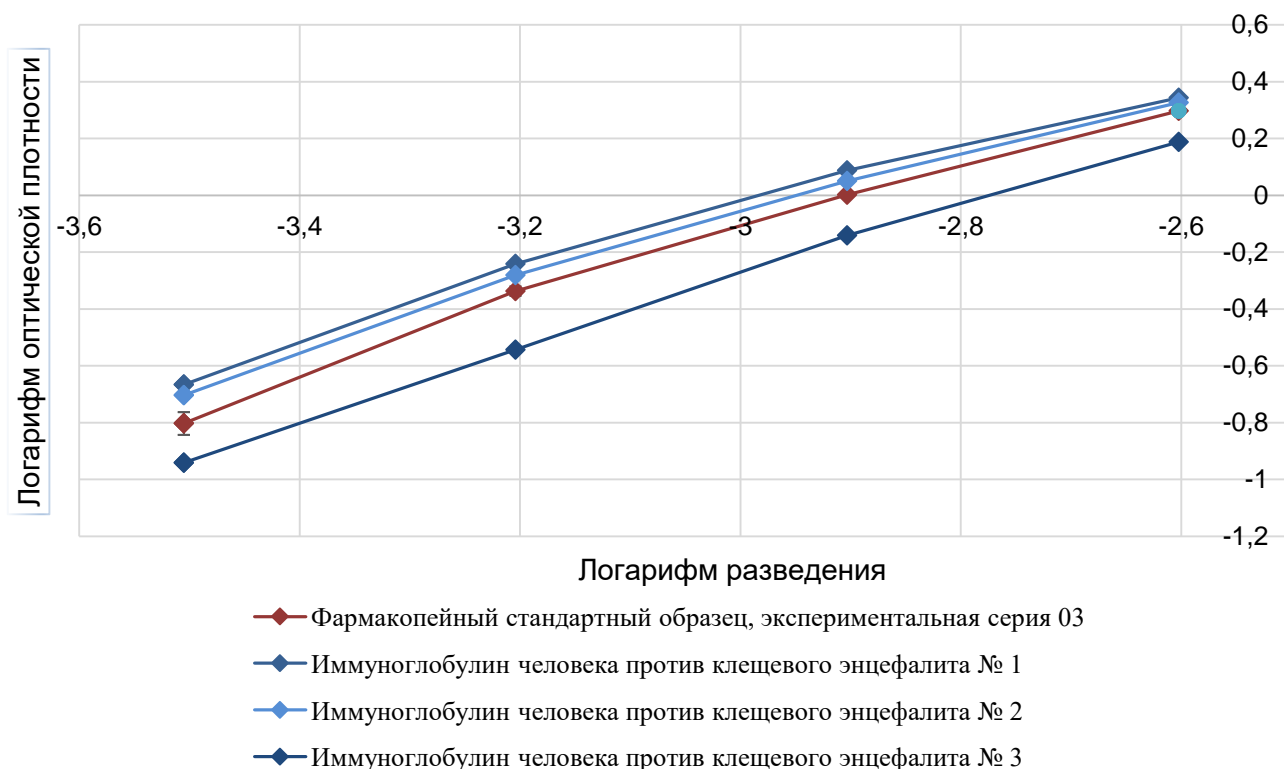
Исследования по разработке методики определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ на основе ИФА проведены с использованием коммерчески доступных тест-систем, зарегистрированных на территории РФ (таблице 18).

Таблица 18 – Характеристика тест-систем для определения IgG к вирусу клещевого энцефалита в иммуноферментном анализе

Наименование набора реагентов	Производитель	Иммуносорбент	Единицы измерения содержания IgG к вирусу КЭ
ВектоВКЭ-IgG	АО «Вектор-Бест», Россия	Культуральный антиген вируса КЭ штамма Софьин (дальневосточный субтип) [30]	Е/мл (до 2015 г.), далее – Ед/мл
ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG	НПО «Диагностические системы», Россия	Рекомбинантный белок, воспроизводящий фрагмент gE [33]	Титр
Anti-TBE Virus ELISA	Euroimmun AG, Германия	Культуральный антиген вируса КЭ штамма K23 (европейский субтип) [149]	Relative Unit (RU/ml)
TBEV / FSME IgG ELISA	IBL International GmbH, Германия	Культуральный антиген вируса КЭ штамма Neudorfl (европейский субтип) [119]	VIENNA Unit (VIEU/ml)
NovaLisa FSME / TBE IgG	Novatec Immunodiagnostica GmbH, Германия	Культуральный антиген вируса КЭ штамма Софьин (дальневосточный субтип) [119]	NovaTec Unit (NTU/ml)
SERION ELISA classic TBE virus IgG	Institut Virion\Serion GmbH, Германия	Фрагмент gE вируса КЭ штамма Софьин (дальневосточный субтип) [114]	Unit (U/ml)

Представленные наборы реагентов сконструированы на основе разных модельных антигенов и отличаются способами выражения результатов ИФА. В их состав входят контрольные образцы и/или калибраторы, аттестованные в соответствующих единицах активности.

Образцы стандарта и препаратов иммуноглобулина человека против КЭ исследованы в серийных разведениях. Результаты измерения ОП после иммуноферментной реакции обработаны методом параллельных линий. Вид кривых «доза-отклик» и результаты дисперсионного анализа на примере обработки данных в программе «Паралайн» представлены на рисунке 7.



Результаты дисперсионного анализа

Источник вариации	Количество степеней свободы	Сумма квадратов отклонений	F-теоретическое	F-экспериментальное	Вывод
Измерения (дозы)	15	5,3676	2,35	85,17	Значимо
Препараты	3	0,2710	3,24	21,50	Значимо
Линейная регрессия	1	5,0415	4,49	1199,87	Значимо
ПАРАЛЛЕЛЬНОСТЬ	3	0,0118	3,24	0,94	ДА
ЛИНЕЙНОСТЬ	8	0,0433	2,59	1,29	ДА
Остаточная ошибка	16	0,0672	—	—	—
Total	31	5,4348	—	—	—

Рисунок 7 – Кривые «доза-отклик» и результаты дисперсионного анализа, полученные при обработке данных анализа стандарта и препаратов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита в программе «Паралайн»

В результате анализа 528 кривых «доза-отклик» установлены оптимальные интервалы значений ОП, в пределах которых выполнялось условие линейности и параллельности (таблица 19).

Таблица 19 – Результаты оценки аналитического диапазона методики определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита при использовании разных наборов реагентов

Тест-система	Аналитический диапазон методики, единицы ОП
ВектоВКЭ-IgG (n = 184)	От 0,1 до 2,0
ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG (n = 128)	От 0,2 до 1,7
Anti-TBE Virus ELISA (n = 96)	От 0,1 до 0,9
TBEV / FSME IgG ELISA (n = 80)	От 0,1 до 2,0
NovaLisa FSME / TBE IgG (n = 12)	От 0,2 до 2,1
SERION ELISA classic TBE virus IgG (n = 28)	От 0,2 до 1,7

Как видно из данных таблицы 19, аналитическая область разрабатываемой методики различается в зависимости от используемой тест-системы. При этом установлено, что в разведении со значением ОП 0,5 в 98 % случаев выполняется условие линейности и параллельности зависимостей логарифма ОП (отклик) от логарифма разведения (дозы). Следовательно, на основании полученных результатов возможно упростить вычисления и использовать обработку не кривой в целом, а область вблизи точки с ОП, равной 0,5. В этом случае алгоритм расчета сводится к следующим этапам:

1. Логарифмирование по основанию 2 (\log_2) значений ОП и величин обратного разведения препаратов и стандарта.
2. Построение линий регрессии вида:

$$y = b \times x + a, \quad (5.3)$$

где x – \log_2 ОП стандарта или исследуемого препарата;

y – \log_2 обратного разведения стандарта или исследуемого образца;

и проверка условия: $R^2 > 0,95$.

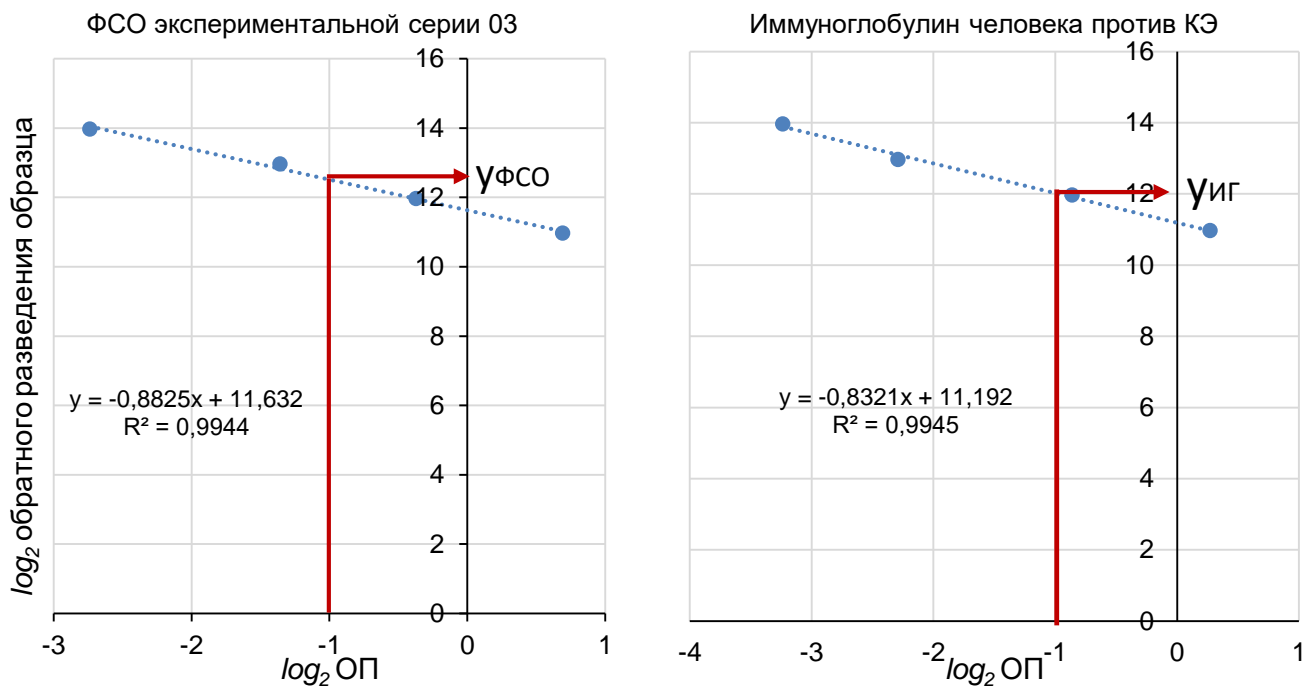
3. Расчет по уравнению линии регрессии значений y при $x = \log_2 0,5 = -1$ для исследуемого препарата и ФСО.

4. Вычисление концентрации IgG к вирусу КЭ в исследуемом препарате по формуле:

$$C = 2^{y_{\text{ИГ}} - y_{\text{ФСО}}} \times A_{\text{ФСО}} \quad (5.4)$$

где C – специфическая активность исследуемого препарата, ЕД/мл;
 $y_{\text{ИГ}}$ – \log_2 обратного разведения исследуемого препарата при ОП=0,5;
 $y_{\text{ФСО}}$ – \log_2 обратного разведения ФСО в точке со значением ОП=0,5;
 $A_{\text{ФСО}}$ – аттестованное значение ФСО, ЕД/мл.

Разработанная математическая модель проиллюстрирована следующим примером. На рисунке 7 представлены линии регрессии, полученные методом наименьших квадратов с использованием программы MS Excel при обработке результатов анализа ФСО экспериментальной серии 03 и образца иммуноглобулина человека против КЭ.



Стрелкой отмечено значение y , которому соответствует ОП= 0,5.

Рисунок 7 – Линии регрессии, полученные при обработке данных анализа ФСО и иммуноглобулина человека против КЭ

Согласно графическим данным, функциональные зависимости имели

выраженный линейный характер ($R^2 > 0,99$). С учетом аттестованного значения (360 ЕД/мл) по формуле (5.4) вычислена концентрации IgG к вирусу КЭ в иммуноглобулине, которая составила 252 ЕД/мл.

На следующем этапе работы сравнили предлагаемый метод расчета (*in house*) с общепринятым (референсным) методом параллельных линий (*PLA*) [140]. В серийных разведениях исследованы ФСО экспериментальной серии 03 и четыре препарата иммуноглобулина. Выполнено по 10 исследований с помощью наборов реагентов ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG, ВектоВКЭ-IgG, Anti-TBE Virus ELISA и TBEV/FSME IgG ELISA (таблица 20).

Таблица 20 – Результаты сравнительного анализа экспериментальных данных, полученных методом параллельных линий (*PLA*) и с использованием предлагаемой математической модели (*in house*)

Наименование набора реагентов, статистический параметр	№ исследования	Содержания IgG к вирусу КЭ в образце №							
		1		2		3		4	
		<i>PLA</i>	<i>in house</i>	<i>PLA</i>	<i>in house</i>	<i>PLA</i>	<i>in house</i>	<i>PLA</i>	<i>in house</i>
ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG	1	301	303	338	339	224	229	398	374
	2	280	292	317	329	228	221	381	393
	3	341	336	391	390	283	276	359	359
	4	344	332	364	375	248	256	408	408
	5	361	355	371	368	272	274	325	333
	6	367	370	402	413	245	233	352	356
	7	297	297	337	344	235	240	363	366
	8	331	320	380	372	244	262	302	290
	9	319	321	408	394	262	280	356	349
	10	317	318	354	351	247	229	339	334
Уровень значимости p для W -критерия Шапиро – Уилка		0,91	0,71	0,87	0,89	0,62	0,21	0,96	0,91
Среднее значение \pm стандартное отклонение, ЕД/мл		326 \pm 28	324 \pm 25	366 \pm 30	368 \pm 27	249 \pm 19	250 \pm 22	358 \pm 32	356 \pm 33
Различия дисперсий (<i>Levene test</i>)		$F = 0,36$ $p = 0,55$		$F = 0,17$ $p = 0,68$		$F = 1,53$ $p = 0,23$		$F = 0,001$ $p = 0,97$	
Различия средних (<i>ANOVA</i>)		$F = 0,01$ $p = 0,91$		$F = 0,01$ $p = 0,92$		$F = 0,02$ $p = 0,90$		$F = 0,02$ $p = 0,89$	
Общее среднее значение \pm стандартное отклонение, ЕД/мл		325 \pm 26		367 \pm 28		249 \pm 20		357 \pm 32	

Продолжение таблицы 20

Наименование набора реагентов, статистический параметр	№ исследования	Содержания IgG к вирусу КЭ в образце №							
		1		2		3		4	
		PLA	<i>in house</i>	PLA	<i>in house</i>	PLA	<i>in house</i>	PLA	<i>in house</i>
ВектоВКЭ-IgG	1	328	326	347	344	226	227	365	360
	2	254	259	364	366	219	228	358	355
	3	316	328	416	410	224	238	360	360
	4	270	274	291	291	281	283	318	327
	5	339	342	332	329	225	220	332	332
	6	310	293	405	388	262	269	357	347
	7	260	275	363	362	232	235	368	365
	8	321	319	353	355	244	231	326	342
	9	335	314	341	353	276	266	340	351
	10	302	300	406	404	209	212	327	331
Уровень значимости p для W -критерия Шапиро – Уилка		0,15	0,71	0,56	0,80	0,18	0,19	0,19	0,43
Среднее значение \pm стандартное отклонение, ЕД/мл		304 \pm 31	303 \pm 27	362 \pm 39	360 \pm 35	240 \pm 25	241 \pm 23	345 \pm 18	347 \pm 14
Различия дисперсий (<i>Levene test</i>)		$F = 0,19$ $p = 0,67$		$F = 0,10$ $p = 0,76$		$F = 0,10$ $p = 0,76$		$F = 3,39$ $p = 0,08$	
Различия средних (<i>ANOVA</i>)		$F = 0,001$ $p = 0,97$		$F = 0,01$ $p = 0,92$		$F = 0,01$ $p = 0,92$		$F = 0,07$ $p = 0,80$	
Общее среднее значение \pm стандартное отклонение, ЕД/мл		303 \pm 29		361 \pm 36		240 \pm 24		346 \pm 16	
Anti-TBE Virus ELISA	1	328	334	376	378	226	206	384	383
	2	334	335	422	428	219	213	416	406
	3	251	248	291	291	224	210	323	328
	4	282	275	374	377	281	284	340	319
	5	257	254	328	330	225	223	355	385
	6	265	298	365	374	262	258	301	317
	7	317	336	375	382	232	272	343	350
	8	277	280	408	404	244	263	380	382
	9	272	268	399	386	276	286	379	407
	10	340	335	416	417	209	218	332	357
Уровень значимости p для W -критерия Шапиро – Уилка		0,14	0,06	0,27	0,23	0,18	0,08	0,92	0,25
Среднее значение \pm стандартное отклонение, ЕД/мл		292 \pm 34	296 \pm 36	375 \pm 41	377 \pm 40	240 \pm 25	243 \pm 32	355 \pm 34	363 \pm 34
Различия дисперсий (<i>Levene test</i>)		$F = 0,05$ $p = 0,83$		$F = 0,02$ $p = 0,89$		$F = 3,12$ $p = 0,09$		$F = 0,05$ $p = 0,83$	
Различия средних (<i>ANOVA</i>)		$F = 0,07$ $p = 0,80$		$F = 0,01$ $p = 0,94$		$F = 0,07$ $p = 0,79$		$F = 0,28$ $p = 0,60$	
Общее среднее значение \pm стандартное отклонение, ЕД/мл		294 \pm 34		376 \pm 39		242 \pm 29		359 \pm 34	

Продолжение таблицы 20

Наименование набора реагентов, статистический параметр	№ исследования	Содержания IgG к вирусу КЭ в образце №							
		1		2		3		4	
		<i>PLA</i>	<i>in house</i>	<i>PLA</i>	<i>in house</i>	<i>PLA</i>	<i>in house</i>	<i>PLA</i>	<i>in house</i>
TBEV/FSME IgG ELISA	1	251	241	304	318	210	209	344	347
	2	340	344	385	387	206	203	372	405
	3	304	302	315	312	245	242	304	305
	4	355	337	405	404	257	250	389	389
	5	303	308	354	363	208	206	314	322
	6	304	307	355	354	223	226	343	347
	7	266	258	341	339	204	205	302	307
	8	294	293	362	361	225	224	316	316
	9	295	294	359	376	237	223	376	379
	10	270	281	378	367	234	252	396	407
Уровень значимости p для W -критерия Шапиро – Уилка		0,58	0,79	0,86	0,86	0,42	0,15	0,23	0,18
Среднее значение \pm стандартное отклонение, ЕД/мл		298 \pm 32	297 \pm 32	356 \pm 31	358 \pm 29	225 \pm 18	224 \pm 19	346 \pm 36	352 \pm 40
Различия дисперсий (<i>Levene test</i>)		$F = 0,0001$ $p = 0,99$		$F = 0,0002$ $p = 0,99$		$F = 0,0005$ $p = 0,98$		$F = 0,27$ $p = 0,61$	
Различия средних (<i>ANOVA</i>)		$F = 0,01$ $p = 0,91$		$F = 0,03$ $p = 0,86$		$F = 0,01$ $p = 0,91$		$F = 0,16$ $p = 0,69$	
Общее среднее значение \pm стандартное отклонение, ЕД/мл		297 \pm 31		357 \pm 29		224 \pm 18		349 \pm 37	

Согласно данным таблицы 20 различия средних результатов определения IgG к вирусу КЭ, полученных с использованием разных вычислительных приемов, отсутствуют ($p > 0,05$). Помимо этого, представлялось важным оценить не только статистическую, но и математическую эквивалентность результатов (их взаимозаменяемость). Для оценки степени близости значений, рассчитанных с помощью предлагаемой математической модели и метода параллельных линий, построены зависимости вида:

$$Y = Ax + B \quad (5.5)$$

где Y – концентрация IgG к вирусу КЭ по методу параллельных линий, ЕД/мл;
 x – концентрация IgG к вирусу КЭ по методу *in house*, ЕД/мл;
 A – коэффициент углового наклона уравнения;
 B – свободный член уравнения.

Математическая эквивалентность результатов двух методов обработки данных достигается при $A \rightarrow 1, B \rightarrow 0$, то есть когда уравнение (5.5) преобразуется

в равенство $Y = x$. Условие $B \rightarrow 0$ выполнено, если значение коэффициента меньше его стандартного отклонения. Данные регрессионного анализа представлены в таблице 21. Графики зависимости результатов, полученных с использованием двух моделей обработки экспериментальных данных, – на рисунке 8.

Таблица 21 – Результаты оценки параметров уравнений регрессии

Параметр	Значение параметра, полученное с использованием набора реагентов			
	ДС-ИФА- АНТИ-ВКЭ- IGG	ВектоВКЭ- IgG	Anti-TBE Virus ELISA	TBEV/FSME IgG ELISA
Коэффициент детерминации R^2	0,97	0,97	0,95	0,98
Коэффициент углового наклона A и его стандартное отклонение	1,00 0,03	1,02 0,03	0,96 0,03	0,95 0,02
Свободный член уравнения B и его стандартное отклонение	-1,19 10,13	-6,99 8,43	7,54 11,30	5,43 11,05
Скорректированный коэффициент углового наклона A'	1,00	1,00	0,99	0,99

Согласно данным таблицы 21, коэффициенты углового наклона $A \geq 0,95$. Абсолютные значения свободного члена B были значительно ниже соответствующих значений стандартного отклонения, что являлось основанием для признания условия $B \rightarrow 0$ и преобразования уравнения (5.5) в $Y = A'x$. Скорректированные значения коэффициентов углового наклона ($A' \geq 0,99$) были близки 1, что указывает на математическую эквивалентность данных, полученных с использованием метода параллельных линий и разработанной математической модели. Таким образом, в результате сравнительного анализа доказана тождественность двух способов обработки экспериментальных данных.

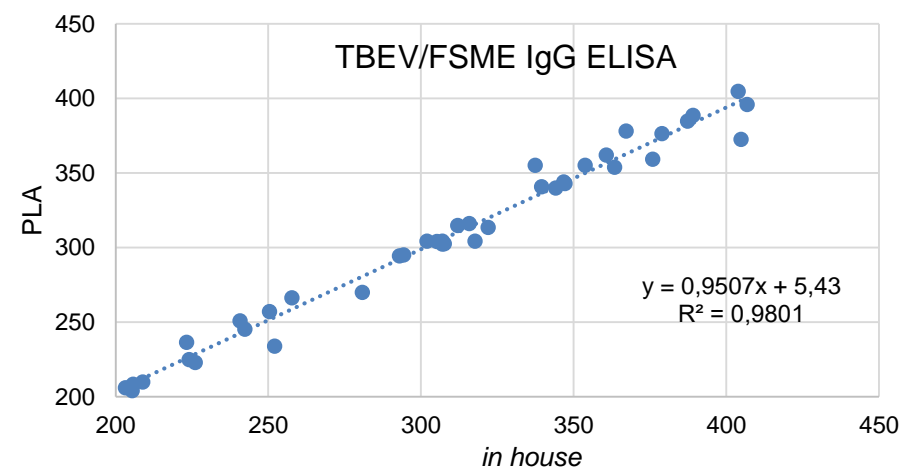
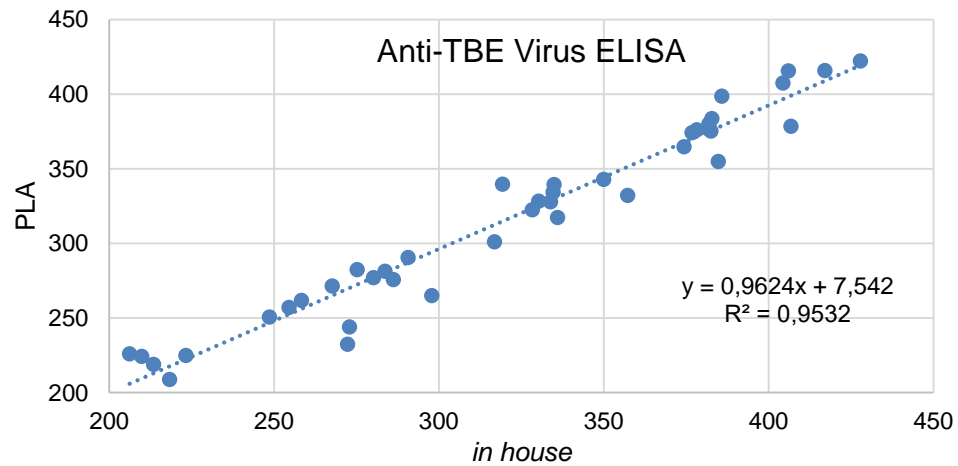
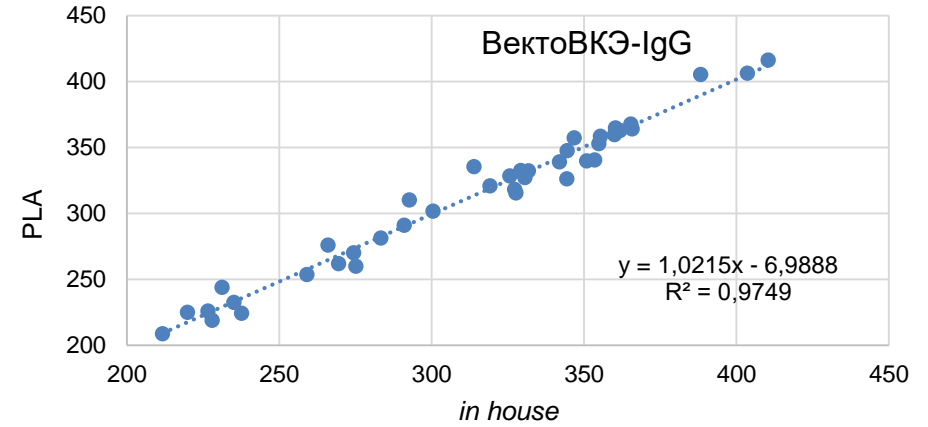
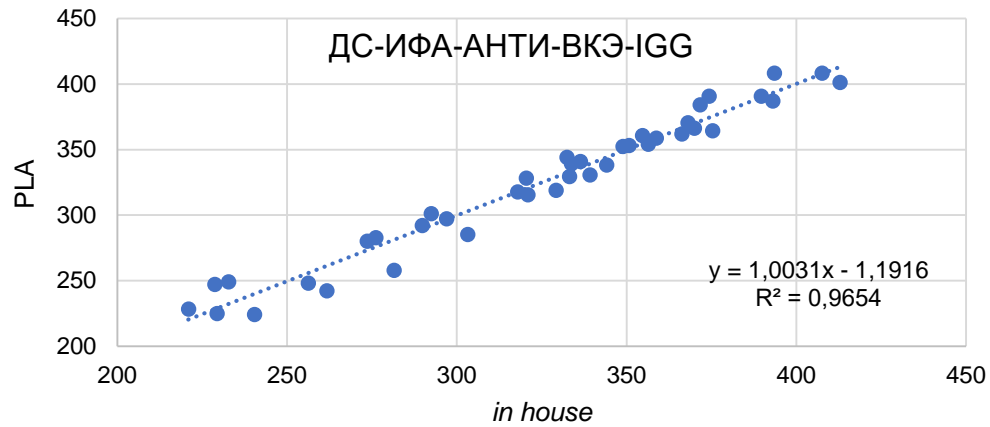


Рисунок 8 – Графики зависимости результатов определения содержания IgG к вирусу клещевого энцефалита, полученных с использованием разработанной математической модели (*in house*) и метода параллельных линий (*PLA*)

Следующим этапом экспериментального обоснования методики явилась ее валидация. Специфичность, линейность, правильность, повторяемость (прецизионность внутри методики), промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность оценены по результатам определения IgG к вирусу КЭ с использованием тест-систем ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG, ВектоВКЭ-IgG, Anti-TBE Virus ELISA, TBEV/FSME IgG ELISA.

Образцами для проведения валидационных исследований служили иммуноглобулины человека против КЭ со специфической активностью 1:160 и 1:320 по данным РТГА трех производителей. В качестве «плацебо» использован иммуноглобулин человека нормальный, по результатам исследования которого в ИФА с применением тест-системы ВектоВКЭ-IgG антитела к вирусу КЭ не выявлены. Поскольку специфическая активность препаратов нормирована показателем не ниже 1:80, мы посчитали необходимым включить в валидационные испытания иммуноглобулин, содержащий указанное количество антител. Таким образом явился ФСО экспериментальной серии 01. Сведения о препаратах, включенных в валидационные испытания, представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Сведения об образцах, включенных в валидационные исследования

Код образца	Описание	Специфическая активность
1	Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита, раствор для внутримышечного введения, производства АО «НПО «Микроген»	1:160
2	Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита, раствор для внутримышечного введения, производства ГБУЗ СО «ОСПК»	1:320
3	Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита, раствор для внутримышечного введения, производства ГБУЗ «ЧОСПК»	1:320
4	Иммуноглобулин человека нормальный, раствор для внутримышечного введения (плацебо)	IgG к вирусу КЭ не выявлены
5	Фармакопейный стандартный образец экспериментальной серии 01, лиофилизат. Аттестованное значение 248 ЕД/мл, неопределенность аттестованного значения от 200 до 296 ЕД/мл	1:80

В ходе валидационных исследований в качестве стандарта использован ФСО экспериментальной серии 03 с аттестованным значением 360 ЕД/мл и неопределенностью – от 285 до 435 ЕД/мл.

Специфичность оценена по способности методики однозначно определять IgG в препаратах иммуноглобулина человека против КЭ (образцы № 1, № 2, № 3 и № 5) и не выявлять в плацебо (образец № 4). Исследования проведены одним аналитиком на одном и том же оборудовании. Результат интерпретирован как отрицательный, если во всех разведениях значение ОП образца было ниже критического, рассчитанного согласно инструкции по применению соответствующей тест-системы. По данным ИФА образцы № 1, № 2, № 3 и № 5 обладали специфической активностью, в образце № 4 IgG к вирусу КЭ не выявлены (таблица 23). На основании полученных результатов сделан вывод о специфичности методики.

Таблица 23 – Результаты оценки специфичности методики определения содержания IgG к вирусу клещевого энцефалита на основе иммуноферментного анализа с использованием ФСО

Наименование набора реагентов	Содержание IgG к вирусу КЭ ($\bar{X} \pm s$) в образце № (количество исследований)				
	1	2	3	4	5
ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IgG	325 ± 25 (n = 10)	367 ± 27 (n = 10)	450 ± 22 (n = 10)	Не выявлены (n = 10)	252 ± 18 (n = 10)
ВектоВКЭ-IgG	303 ± 27 (n = 10)	360 ± 35 (n = 10)	441 ± 24 (n = 10)	Не выявлены (n = 10)	248 ± 17 (n = 10)
Anti-TBE Virus ELISA	296 ± 36 (n = 10)	377 ± 40 (n = 10)	441 ± 32 (n = 10)	Не выявлены (n = 10)	244 ± 27 (n = 10)
TBEV/FSME IgG ELISA	296 ± 32 (n = 10)	358 ± 29 (n = 10)	424 ± 19 (n = 10)	Не выявлены (n = 10)	239 ± 25 (n = 10)

Для подтверждения линейности должен быть доказан прямо пропорциональный характер зависимости аналитического сигнала от содержания анализируемого вещества в диапазоне ее применения. Критерий приемлемости – значение коэффициента детерминации не ниже 0,95 ($R^2 \geq 0,95$). Результаты оценки линейности представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Результаты оценки линейности методики определения содержания IgG к вирусу клещевого энцефалита на основе иммуноферментного анализа с использованием ФСО

Наименование набора реагентов	№ исследования	Значение коэффициента детерминации R^2 , полученное при анализе образца №			
		1	2	3	5
ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG	1	0,99	0,99	0,99	1,00
	2	1,00	1,00	1,00	1,00
	3	0,99	1,00	1,00	0,99
	4	0,99	0,99	1,00	0,99
	5	1,00	1,00	1,00	1,00
	6	1,00	1,00	0,99	1,00
	7	1,00	0,99	1,00	0,99
	8	0,99	1,00	0,99	1,00
	9	1,00	1,00	1,00	1,00
	10	1,00	0,99	0,98	1,00
Минимальное значение R^2		0,99	0,99	0,98	0,99
ВектоВКЭ-IgG	1	0,98	0,99	1,00	0,99
	2	1,00	1,00	1,00	1,00
	3	1,00	1,00	1,00	0,99
	4	0,99	1,00	0,99	1,00
	5	1,00	1,00	1,00	1,00
	6	1,00	1,00	0,99	1,00
	7	1,00	0,99	1,00	1,00
	8	0,99	1,00	1,00	1,00
	9	1,00	1,00	1,00	0,99
	10	1,00	0,99	1,00	1,00
Минимальное значение R^2		0,98	0,99	0,99	0,99
Anti-TBE Virus ELISA	1	0,99	0,99	0,98	1,00
	2	1,00	1,00	1,00	1,00
	3	1,00	1,00	1,00	0,99
	4	0,99	1,00	1,00	1,00
	5	1,00	1,00	1,00	1,00
	6	1,00	1,00	0,99	1,00
	7	1,00	0,99	1,00	1,00
	8	0,99	1,00	0,99	1,00
	9	1,00	1,00	1,00	1,00
	10	1,00	0,98	1,00	1,00
Минимальное значение R^2		0,99	0,99	0,99	0,99
TBEV/FSME IgG ELISA	1	0,98	0,99	0,98	0,99
	2	1,00	1,00	1,00	1,00
	3	0,97	1,00	1,00	0,99
	4	0,99	0,97	0,97	0,98
	5	1,00	1,00	1,00	1,00
	6	0,98	1,00	0,99	1,00
	7	1,00	0,99	1,00	0,99
	8	0,99	1,00	0,99	1,00
	9	1,00	0,96	1,00	0,96
	10	1,00	0,98	0,98	1,00
Минимальное значение R^2		0,97	0,96	0,97	0,96

Согласно данным, представленным в таблице 24, минимальное значение R^2 составило 0,96. Следовательно, валидируемая методика удовлетворяет критерию линейности.

Правильность методики проверена с использованием образца с известным содержанием анализируемого вещества (ФСО экспериментальной серии 01, закодированного как образец № 5). Критерием приемлемости явилось нахождение доверительного интервала среднего в пределах неопределенности аттестованного значения ФСО – от 200 до 296 ЕД/мл. Результаты оценки правильности представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Результаты оценки правильности методики определения содержания IgG к вирусу клещевого энцефалита на основе иммуноферментного анализа с использованием фармакопейного стандартного образца

№ образца, оцениваемый параметр	Единица измерения	Результат определения содержания IgG к вирусу КЭ с использованием наборов реагентов			
		ДС-ИФА- АНТИ- ВКЭ-IGG	ВектоВКЭ- IgG	Anti-TBE Virus ELISA	TBEV/FSME IgG ELISA
5 (ФСО экспериментальной серии 01)	ЕД/мл	233	232	283	273
		256	247	256	206
		266	265	228	228
		282	244	219	219
		249	251	285	265
		234	231	217	217
		274	274	250	247
		233	255	229	215
		259	260	212	255
		238	217	257	269
Среднее значение содержания IgG к вирусу КЭ		252	248	244	239
Доверительный интервал среднего значения		240 – 266	235 – 260	225 – 263	221 – 257
Смещение среднего значения относительно аттестованного	%	1,6	0,0	– 1,6	– 3,6

Как видно из данных таблицы 25, доверительные интервалы средних значений содержания IgG к вирусу КЭ находились в пределах неопределенности аттестованного значения – от 200 ЕД/мл до 296 ЕД/мл. Следовательно, валидируемая методика соответствует критерию правильности. Помимо этого, рассчитаны минимальное и максимальное смещения среднего результата от аттестованного значения, которые составили минус 3,6 и 1,6 % соответственно.

Повторяемость оценена по результатам 10 определений содержания IgG к вирусу КЭ в образцах № 1, № 2, № 3 и № 5, выполненных одним аналитиком с использованием одного и того же оборудования. Критерием приемлемости явилось $CV \leq 15 \%$. Результаты исследования представлены в таблице 26, согласно данным которой разброс значений содержания IgG к вирусу КЭ, полученных в условиях повторяемости, характеризовался коэффициентами вариации от 4 до 12 % и не превышал 15 %.

Анализ промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности проведен по результатам 10 определений содержания IgG к вирусу КЭ в образцах № 1, № 2, № 3 и № 5 с использованием наборов реагентов разных производителей, выполненных в течение 10 месяцев (факторы вариабельности – аналитическая система и время). Критерием приемлемости явилась статистическая эквивалентность дисперсий, а также средних результатов определений, полученных для одноименных образцов с применением тест-систем разных производителей. Величина коэффициента вариации объединенных данных не должна превышать 15 %. Результаты оценки промежуточной прецизионности методики представлены в таблице 27.

Таблица 26 – Результаты оценки повторяемости методики определения содержания IgG к вирусу клещевого энцефалита на основе иммуноферментного анализа с использованием ФСО

№ образца	Набор реагентов	Результат определения IgG к вирусу КЭ (ЕД/мл) в исследовании №										Результаты статистической обработки			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	<i>p</i>	\bar{X} , ЕД/мл	<i>s</i> , ЕД/мл	<i>CV</i> , %
1	<i>ДС</i>	292	303	336	332	355	370	297	320	321	318	0,71	325	25	8
	<i>ВБ</i>	326	259	328	274	342	293	275	319	314	300	0,72	303	27	9
	<i>ЕI</i>	334	335	248	275	254	298	336	280	268	335	0,06	296	36	12
	<i>IBL</i>	241	344	302	337	308	307	258	293	294	281	0,77	296	32	11
2	<i>ДС</i>	339	329	390	375	368	413	344	372	394	351	0,89	367	27	7
	<i>ВБ</i>	344	366	410	291	329	388	362	355	353	404	0,79	360	35	10
	<i>ЕI</i>	378	428	291	377	330	374	382	404	386	417	0,22	377	40	11
	<i>IBL</i>	318	387	312	404	363	354	339	361	376	367	0,86	358	29	8
3	<i>ДС</i>	429	421	476	456	474	433	440	462	481	429	0,26	450	22	5
	<i>ВБ</i>	427	428	438	483	420	469	435	431	466	412	0,19	441	24	5
	<i>ЕI</i>	406	413	410	484	423	458	442	473	486	418	0,12	441	32	7
	<i>IBL</i>	409	403	442	450	406	426	405	424	423	452	0,14	424	19	4
5	<i>ДС</i>	233	256	266	282	249	234	274	233	259	238	0,28	252	18	7
	<i>ВБ</i>	232	247	265	244	251	231	274	255	260	217	0,19	248	17	7
	<i>ЕI</i>	283	256	228	219	285	217	250	229	212	257	0,12	244	27	11
	<i>IBL</i>	273	206	228	219	265	217	247	215	255	269	0,14	239	25	11

Примечание – *p* – уровень значимости для *W*-критерия Шапиро-Уилка; \bar{X} – среднее арифметическое; *s* – стандартное отклонение; *CV* – коэффициент вариации; ДС – ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IgG; ВБ – ВектоВКЭ-IgG; ЕI – Anti-TBE Virus ELISA; IBL – TBEV/FSME IgG ELISA

Таблица 27 – Результаты оценки промежуточной прецизионности методики определения содержания IgG к вирусу клещевого энцефалита на основе иммуноферментного анализа с использованием ФСО

№ образца (количество исследований)	Результаты статистической обработки			
	различия дисперсий (<i>Levene test</i>)	различия средних (<i>ANOVA</i>)	$\bar{X}_{\text{общ}} \pm S_{\text{общ}}$, ЕД/мл	$CV_{\text{общ}}$, %
1 (n = 40)	не значимы ($p = 0,39$)	не значимы ($p = 0,14$)	305 ± 31	10
2 (n = 40)	не значимы ($p = 0,92$)	не значимы ($p = 0,60$)	366 ± 33	9
3 (n = 40)	не значимы ($p = 0,12$)	не значимы ($p = 0,14$)	439 ± 25	6
5 (n = 40)	не значимы ($p = 0,22$)	не значимы ($p = 0,77$)	245 ± 23	9

Согласно данным таблицы 27 при оценке значимости различий дисперсий (*Levene test*) и средних (*ANOVA*) значение p было выше 0,05, что указывало на эквивалентность результатов ИФА, полученных для одноименных образцов с использованием разных наборов реагентов в течение длительного промежутка времени. Максимальное значение коэффициента вариации в объединенных выборках составило 10 %. Таким образом, валидируемая методика отвечает критерию промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности.

Результаты валидационных исследований обобщены в таблице 28.

Таблица 28 – Результаты валидации методики определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита на основе иммуноферментного анализа с использованием ФСО

Валидационная характеристика методики	Критерии приемлемости	Полученный результат	Соответствие критерию приемлемости (Да/Нет)
Специфичность	В образце № 4 (плацебо) IgG к вирусу КЭ не должны выявляться	В образце № 4 (плацебо) IgG к вирусу КЭ не выявлены	Да
	В образцах № 1, № 2, № 3 и № 5 IgG к вирусу КЭ должны выявляться	В образцах № 1, № 2, № 3 и № 5 IgG к вирусу КЭ выявлены	Да
Линейность	Коэффициент детерминации R^2 должен быть не менее 0,95	$R^2_{\text{min}} = 0,96$	Да

Продолжение таблицы 28

Валидационная характеристика методики	Критерии приемлемости	Полученный результат	Соответствие критерию приемлемости (Да/Нет)
Правильность	При анализе образца № 5 доверительный интервал среднего значения должен находиться в пределах неопределенности аттестованного значения ФСО	При анализе образца № 5 доверительные интервалы среднего значения, полученные с использованием разных наборов реагентов, находились в пределах неопределенности от 200 до 296 ЕД/мл	Да
Повторяемость (прецизионность внутри методики)	$CV \leq 15 \%$	$CV_{max} = 12 \%$	Да
Промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность	Различия дисперсий должны быть не значимыми, $p > 0,05$ (<i>Levene test</i>)	Различия дисперсий не значимы ($p > 0,05$)	Да
	Различия средних должны быть не значимыми, $p > 0,05$ (<i>ANOVA</i>)	Различия средних не значимы ($p > 0,05$)	Да
	$CV_{общ} \leq 15 \%$	$CV_{общ.} = 10 \%$	Да

По итогам проведенных исследований сделан вывод о том, что разработанная методика количественного определения IgG к вирусу КЭ с использованием ФСО пригодна для контроля специфической активности препаратов иммуноглобулина человека против КЭ.

Таким образом, по результатам экспериментального обоснования методики обоснованы принцип выбора разведений ФСО и препарата, позволяющий получать результаты в линейном диапазоне тест-систем (интервал ОП соответствующих разведений стандарта и иммуноглобулина должен включать значение 0,5), а также алгоритм расчета концентрации IgG к вирусу КЭ. Благодаря применению ФСО достигнута унификация результатов ИФА, полученных с использованием разных наборов реагентов. Разработанная методика специфична, линейна, прецизионность характеризуется коэффициентом вариации, не превышающим 15 %, правильность – смещением среднего результата относительно аттестованного значения в интервале от минус 3,6 до 1,6 %.

5.3 Изучение специфической активности коммерческих серий иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита с использованием фармакопейного стандартного образца

Экспериментальное изучение специфической активности препаратов иммуноглобулина человека против КЭ методами РТГА и ИФА с использованием ФСО проведено совместно со специалистами лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России И.Л. Арефьевой (ведущий микробиолог) и Э.Ю. Кудашевой (д.м.н., начальник лаборатории). Образцами для исследования явились 68 серий лекарственных препаратов, выпущенных производственными площадками АО «НПО «Микроген», расположенными в г. Томске и г. Перми ($n = 36$), и ГБУЗ «ЧОСПК» ($n = 32$), в период 2017 - 2021 гг.

Результаты РТГА выражены в титрах антител, которые рассчитаны по формулам (5.1) и (5.2) относительно аттестованного значения ФСО. ИФА выполнено с использованием наборов реагентов: ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-IGG (тест-система 1); ВектоВКЭ-IgG (тест-система 2); Anti-TBE Virus ELISA (тест-система 3); TBEV/FSME IgG ELISA (тест-система 4); FSME/TBE Virus IgG (тест-система 5). Выбор разведений испытуемых образцов осуществлен таким образом, чтобы в соответствующий интервал ОП входило значение 0,5, кривые «доза-отклик» были линейны ($R^2 > 0,95$). Этому условию соответствовали следующие разведения ФСО и препаратов:

- от 1:450 до 1:1520, либо от 1:1200 до 1:4050 (шаг между последовательными разведениями 1,5) для тест-системы 1;
- от 1:1000 до 1:8000 для тест-системы 2;
- от 1:400 до 1:3200 для тест-системы 3;
- от 1:800 до 1:6400 для тест-систем 4 и 5.

ИФА проведено в соответствии с инструкциями по применению наборов реагентов, обработка результатов – согласно разработанному алгоритму расчета концентрации IgG в исследуемом образце по отношению к стандарту. Результаты определения специфической активности приведены в таблице 29.

Таблица 29 – Результаты определения специфической активности препаратов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита с использованием ФСО

№ образца	Титр антител в РТГА	Результат ИФА		№ образца	Титр антител в РТГА	Результат ИФА	
		\bar{X} , ЕД/мл (n = 5)	CV, %			\bar{X} , ЕД/мл (n = 5)	CV, %
1	1:320	392	9,8	35	1:160	324	9,5
2	1:160	337	9,2	36	1:160	337	4,9
3	1:160	353	9,1	37	1:80	264	5,3
4	1:80	225	5,9	38	1:160	338	8,8
5	1:320	370	9,7	39	1:160	339	7,7
6	1:160	315	5,2	40	1:80	230	6,3
7	1:160	340	7,3	41	1:160	340	9,0
8	1:80	259	4,7	42	1:160	349	4,2
9	1:80	266	5,1	43	1:160	350	3,9
10	1:320	649	3,6	44	1:80	245	4,8
11	1:80	269	3,6	45	1:320	360	6,3
12	1:160	280	5,1	46	1:160	328	7,1
13	1:160	297	6,1	47	1:160	351	4,8
14	1:320	381	6,5	48	1:160	352	7,5
15	1:160	305	7,3	49	1:160	357	5,3
16	1:320	478	5,9	50	1:160	349	9,3
17	1:320	484	3,6	51	1:320	362	6,9
18	1:160	321	4,7	52	1:320	364	4,8
19	1:320	392	5,4	53	1:160	318	11,0
20	1:160	349	10,4	54	1:320	415	8,1
21	1:160	328	9,7	55	1:320	439	3,8
22	1:320	363	6,9	56	1:320	469	9,1
23	1:320	376	4,5	57	1:160	306	7,5
24	1:320	360	11,8	58	1:80	239	6,2
25	1:320	366	4,5	59	1:320	529	7,6
26	1:80	223	4,1	60	1:320	537	5,9
27	1:160	301	3,8	61	1:320	617	5,3
28	1:320	386	8,1	62	1:80	266	4,3
29	1:160	322	3,8	63	1:160	355	5,7
30	1:80	248	3,5	64	1:160	349	9,0
31	1:320	393	6,0	65	1:160	340	8,3
32	1:160	333	10,6	66	1:160	315	4,0
33	1:320	395	4,8	67	1:320	396	5,2
34	1:160	347	6,1	68	1:320	403	3,9

Согласно данным, приведенным в таблице 29, титр антител к вирусу КЭ варьировал от 1:80 до 1:320, концентрация IgG – от 223 ЕД/мл до 649 ЕД/мл. Значения CV результатов, полученных с использованием разных наборов реагентов, находились в диапазоне от 3,5 % до 11,8 % и удовлетворяли установленному критерию прецизионности – не выше 15 %. Таким образом, на этапе апробации методики в условиях ее применения в рамках контроля и экспертизы качества указанных лекарственных средств с использованием ФСО показана возможность унификации данных ИФА.

Вместе с тем, важное прикладное значение имеет возможность соотнесения результатов двух методов определения специфической активности. Следует отметить, что значения титра антител дискретны, при этом их кратность весьма высокая – 2. В то же время результаты ИФА непрерывны. Существенное отличие в математических шкалах оценки экспериментальных данных является серьезным ограничением в определении математической зависимости данных ИФА и РТГА. Помимо этого, такая модель пересчета должна быть простой и понятной для практического применения. В связи с этим, на наш взгляд, наиболее пригоден способ перевода, основанный на использовании эмпирически установленного соответствия титра антител диапазону концентрации IgG к вирусу КЭ (ЕД/мл).

По результатам РТГА (таблица 29) в 11 образцах иммуноглобулина человека против КЭ титр антител составил 1:80 (группа 1), в 30 – 1:160 (группа 2), в 27 – 1:320 (группа 3). Распределение концентрации IgG к вирусу КЭ по данным ИФА в указанных группах препаратов представлено на рисунке 9.

Различия в данных ИФА между группами 1, 2 и 3 являлись статистически значимыми ($p < 0,0001$). При этом значение коэффициента ранговой корреляции Спирмена, равное 0,89, свидетельствовало о высокой степени связи результатов двух методов. Все это указывало на возможность определения соотношения между данными ИФА и РТГА.

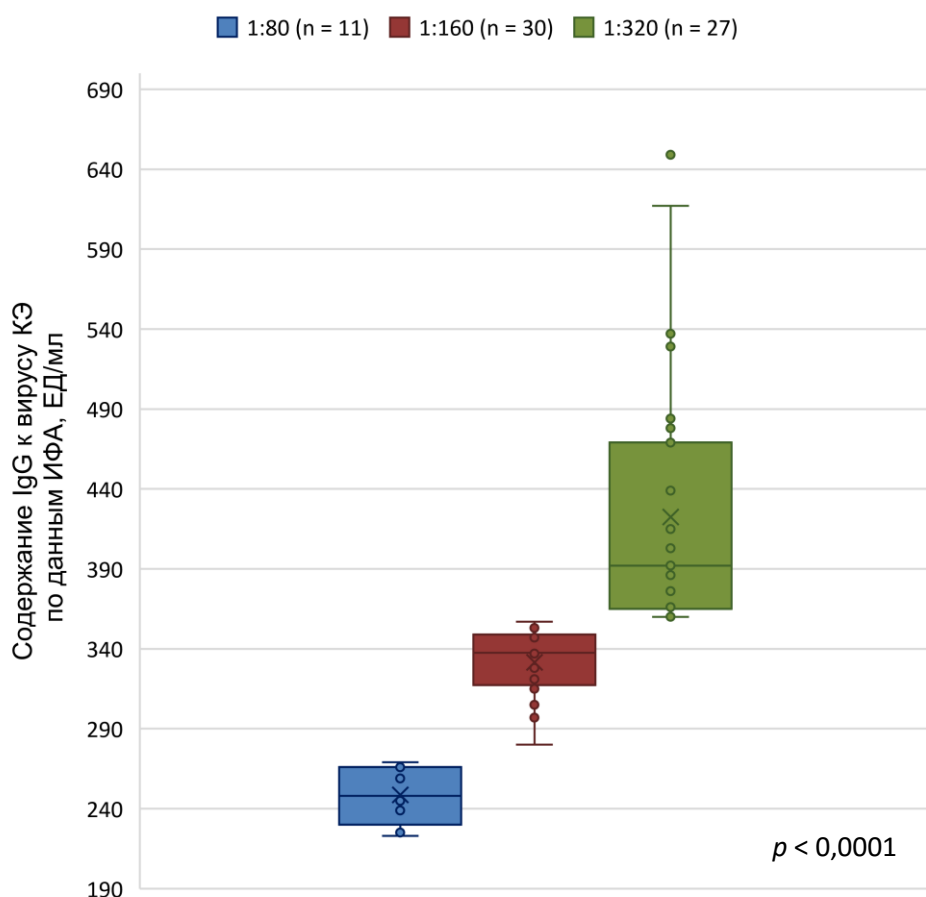


Рисунок 9 – Специфическая активность препаратов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита (n = 68)

На основании экспериментальной оценки специфической активности с использованием ФСО эмпирически установлено соответствие титра антител диапазону концентрации IgG к вирусу КЭ (таблица 30).

Таблица 30 – Результаты экспериментальной оценки соответствия титра антител диапазону концентрации IgG к вирусу клещевого энцефалита

Титр антител к вирусу КЭ по данным РТГА	Содержание IgG к вирусу КЭ по данным ИФА, ЕД/мл
1:80	200* ... 269
1:160	270 ... 359
1:320	360 ... 650

* Нижняя граница установлена по результатам аттестации первичного ФСО методом ИФА (п. 4.2).

5.4 Экономическое обоснование определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита с использованием фармакопейного стандартного образца

Для оценки экономической эффективности определен размер выгоды от использования ФСО. Дополнительные затраты, связанные с применением стандарта, исходя из стоимости одного флакона (5 000 рублей) и расхода на контроль специфической активности одной серии препарата (0,1 флакона ФСО), составили 0,04 % от общей стоимости серии иммуноглобулина человека против КЭ, которая в среднем равна 1 111 750 рублей.

Каждая партия препарата проходит обязательный контроль качества на предприятии-производителе и государственную экспертизу, по итогам которой принимается решение о вводе лекарственного средства в гражданский оборот. Благодаря использованию ФСО достигается повышение достоверности и унификация результатов определения специфической активности. Это снижает риск несоответствия результатов оценки показателя, полученных в разных лабораториях на этапах выходного контроля и независимой экспертизы качества иммуноглобулина человека против КЭ.

В том случае, если препарат одобрен отделом контроля качества производителя, но не прошел государственный контроль, может быть принято решение об утилизации забракованной партии или ее переработке. Мы оценили затраты, которые несет при этом производитель, по состоянию на февраль 2022 года (таблица 31).

Из данных, представленных в таблице 31, видно, что убытки производителя при выбраковке одной серии препарата по результатам экспертизы качества даже в случае дальнейшей переработки составят 38 % от стоимости партии. Это значительно превышает рассчитанные ранее затраты, связанные с применением ФСО.

Таблица 31 – Затраты производителя при выбраковке одной серии иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита по результатам экспертизы качества

Показатель для расчета затрат	Затраты производителя при утилизации забракованной серии иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита	Показатель для расчета затрат	Затраты производителя при переработке забракованной серии иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита
Стоимость одной серии, руб.	1 111 750	Стоимость переработки, руб.	76 000
		Стоимость выходного контроля качества, руб.	55 000
Расходы на утилизацию, руб.	525	Стоимость экспертизы качества, руб.	176 000
		Расходы, связанные с простоем производства, руб.	110 000
Итого:		Итого:	
Абсолютные затраты, руб.	1 112 275	Абсолютные затраты	417 000
Относительные затраты, % от общей стоимости серии	100,05	Относительные затраты, % от общей стоимости серии	37,50

Таким образом, оценка специфической активности иммуноглобулина человека с использованием разработанного стандарта экономически оправдана и значительно снижает затраты производителя иммуноглобулина человека против КЭ.

ГЛАВА 6 РАЗРАБОТКА НОРМАТИВНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ НА ФАРМАКОПЕЙНЫЙ СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ

Результатом проведенного исследования стало оформление комплекта нормативно-технологической документации на ФСО. Для обеспечения единого подхода к производству, оценке качества и аттестации стандарта разработана Инструкция по изготовлению, контролю и аттестации ФСО (Приложение А, титульный лист). В документ включены следующие разделы:

- характеристика фармакопейного стандартного образца;
- сырье и материалы;
- технологическая схема получения фармакопейного стандартного образца;
- аппаратурная схема и спецификация на оборудование;
- изложение технологического процесса и контрольные операции;
- контроль изготовления;
- требования безопасности;
- перечень производственных инструкций;
- технико-экономические нормативы;
- информационные материалы.

В разделе «Характеристика стандартного образца» указаны его название и назначение, информация о разработчике, аттестуемые и дополнительные характеристики, краткое описание свойств, сведения об упаковке, маркировке, условиях хранения, транспортирования и сроке годности ФСО.

В разделе «Сырье и материалы» содержится перечень, наименование и требования к квалификации материалов и реагентов для производства, контроля и аттестации ФСО.

Согласно технологической схеме (рисунок 10) процесс получения ФСО состоит из четырех стадий производства, пяти стадий контрольных операций и стадии упаковочно-маркировочных работ.

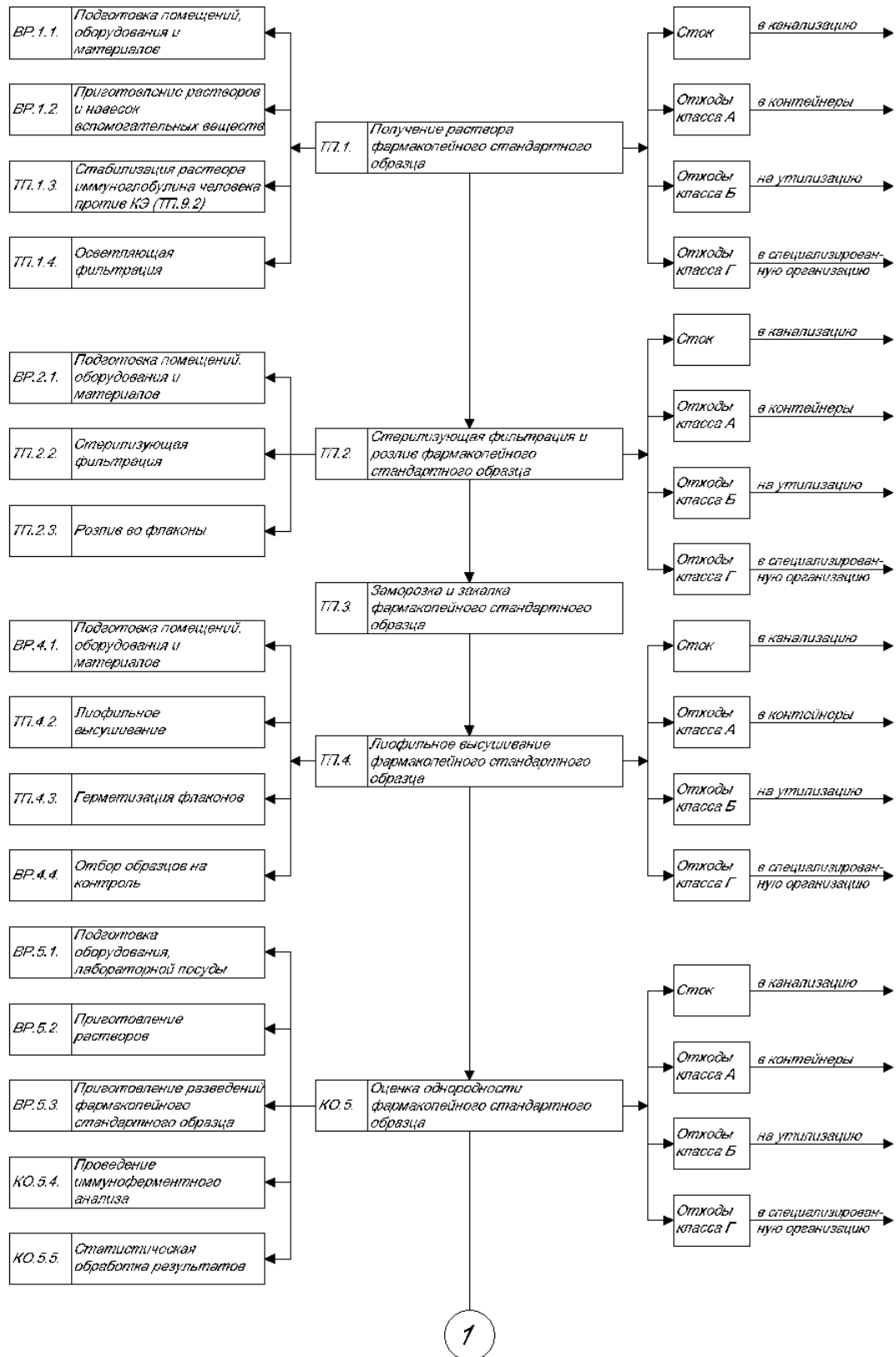


Рисунок 10.А – Технологическая схема получения, контроля и аттестации ФСО содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита

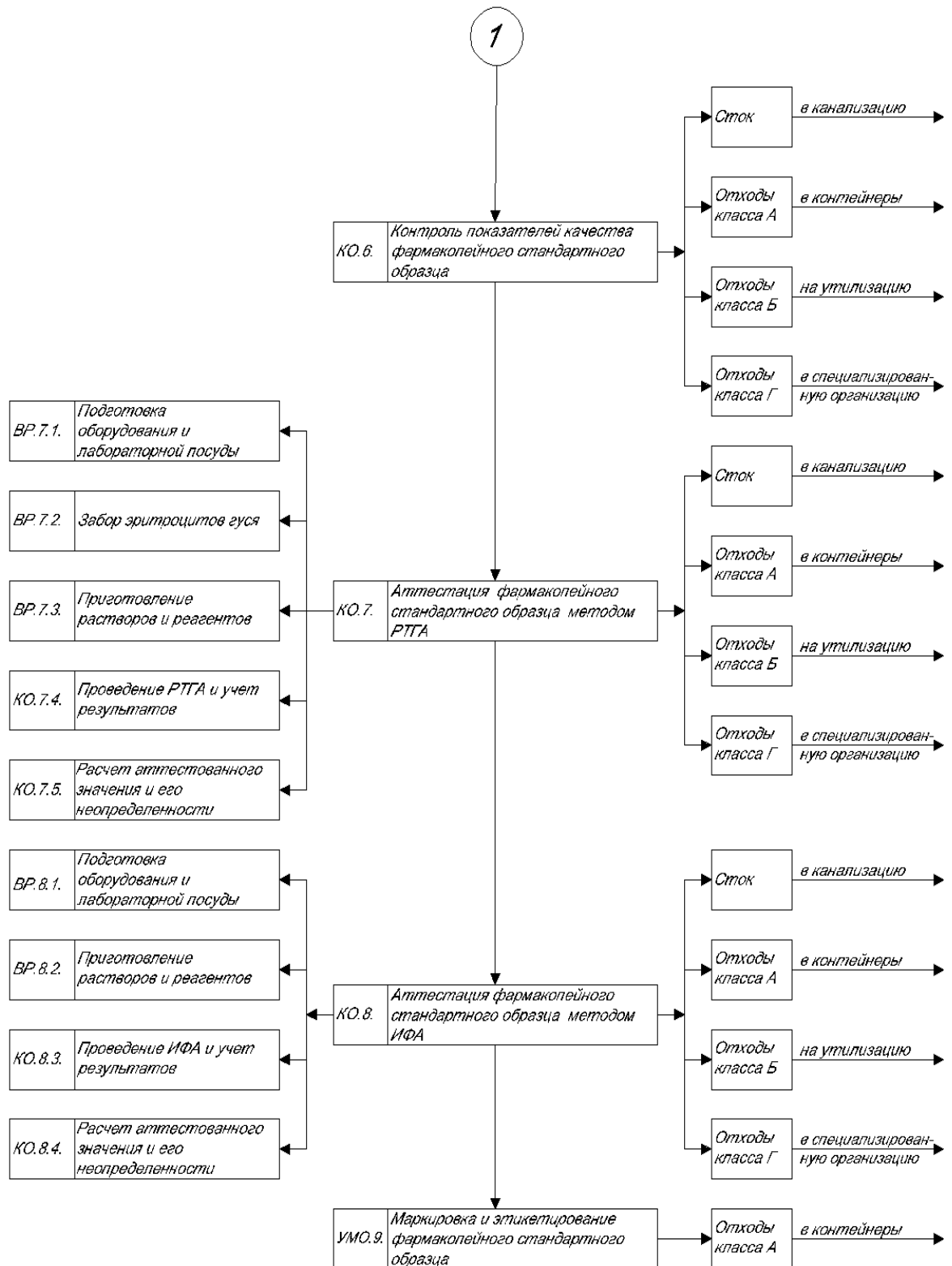


Рисунок 10.Б – Технологическая схема получения, контроля и аттестации ФСО содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита

На этапе ТП.1 в полупродукт иммуноглобулина человека против КЭ добавляют стабилизаторы, корректируют рН, измеряют объем раствора ФСО. Затем в асептических условиях подвергают стерилизующей фильтрации в

промежуточную емкость. Непрерывно перемешивая, раствор ФСО разливают во флаконы, которые неплотно укупоривают пробками для лиофилизации (ТП.2). На стадии ТП.3 образец подвергают заморозке и закалке с использованием морозильного оборудования. После чего кассеты с флаконами размещают на полках лиофильной установки (ТП.4). В завершении лиофильного высушивания флаконы плотно укупоривают пробками, накрывают колпачками и вальцуют. На емкости с ФСО наносят временную технологическую этикетку и хранят в лабораторном холодильнике при температуре от 2 до 8 °С в промаркированных поддонах с указанием наименования, стадии и даты производства, и подписью ответственного исполнителя.

Затем отбирают флаконы с ФСО для исследования однородности (КО.5) и контроля показателей качества (КО.6). Метрологическую аттестацию методами РТГА и ИФА выполняют согласно этапам КО.7 и КО.8. После определения аттестуемых характеристик переходят к стадии маркировки ФСО (УМО.1).

Разработанная аппаратурная схема изготовления представлена на рисунке 11. В таблице 32 приведен перечень основного оборудования с указанием норм оснащения технологических помещений и аналитических лабораторий. Спецификация оборудования включает в себя сведения о наименовании, характеристике и количестве единиц оборудования и средств измерений, задействованных в производственном цикле.

В разделе «Контроль изготовления» представлены контрольные точки при получении ФСО, обеспечивающие соблюдение технологического режима и контрольных операций, а также описан порядок оценки стабильности.

На основе Инструкции по изготовлению, контролю и аттестации ФСО разработаны технологические инструкции, обязательные для исполнения на всех этапах его получения. Их перечень представлен в разделе 8 указанного документа.

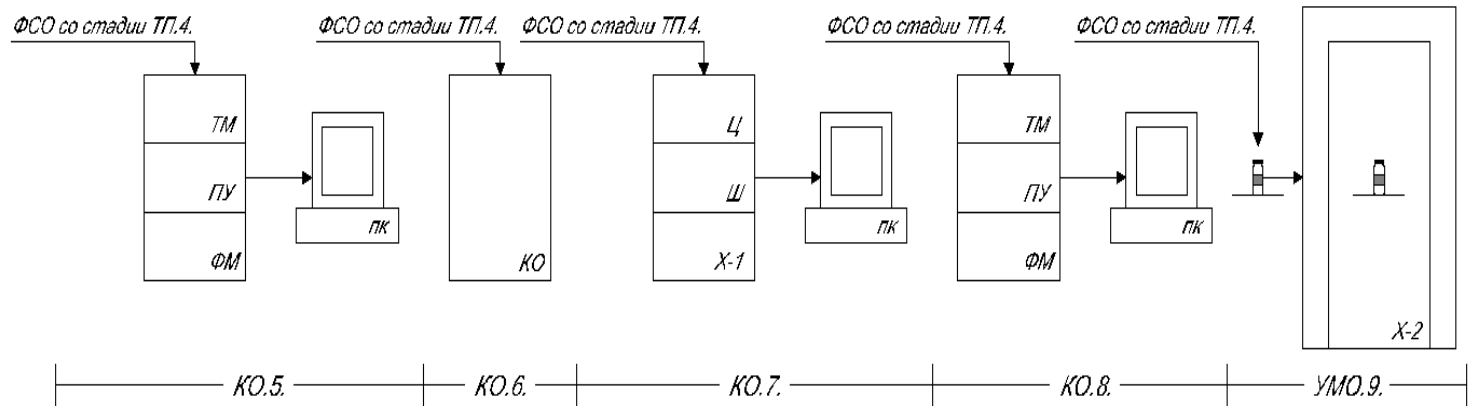
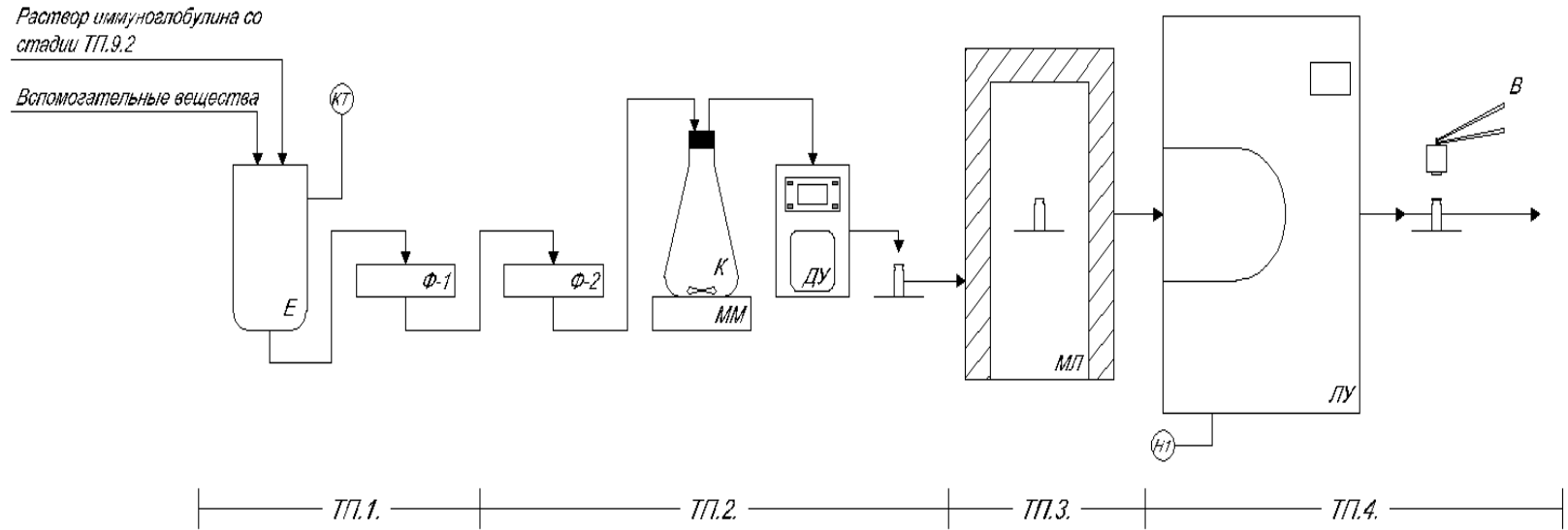


Рисунок 11 – Аппаратурная схема технологического процесса и контрольных операций получения ФСО содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита

Таблица 32 – Спецификация основного оборудования и нормы оснащения

Наименование оборудования	Обозначение на аппаратурной схеме	Количество единиц оборудования
Емкость вместимостью 2 л	Е	1
Вакуумный насос	Н1, Н2	2
Установка для осветляющей фильтрации в составе: напорная емкость, вакуумный насос, фильтр-капсула с размером пор 0,8 мкм, промежуточная емкость	Ф-1	1
Установка для стерилизующей фильтрации в составе: напорная емкость, вакуумный насос, фильтр-капсула с размером пор 0,22 мкм, промежуточная емкость	Ф-2	1
Колба коническая стеклянная объемом 2 л	К	1
Магнитная мешалка	ММ	1
Дозирующее устройство	ДУ	1
Морозильный ларь	МЛ	1
Лиофилизационная установка	ЛУ	1
Устройство для обжима колпачков	В	1
Термометр для микропланшетов	ТМ	1
Промывочное устройство	ПУ	1
Фотометр для микропланшетов	ФМ	1
Персональный компьютер	ПК	1
Комплект оборудования для проведения контроля качества ФСО*	КО	1
Центрифуга лабораторная	ЦЛ	1
Орбитальный шейкер	ОШ	1
Холодильник лабораторный	Х-1, Х-2	2
* Комплект оборудования, используемый на стадии КО.6, включает в себя шкаф вакуумный сушильный, фотоэлектроколориметр, иономер, устройство для электрофореза белков сыворотки крови на пленках из ацетата целлюлозы, систему для высокоэффективной жидкостной хроматографии, аппарат для электрофореза белков в геле, весы аналитические, термостат суховоздушный, иммунохимический анализатор.		

В главе «Технико-экономические нормативы» приведены сведения о выходе продукта на стадиях технологического процесса, а также нормы расхода исходного сырья, промежуточного продукта и вспомогательных материалов из расчета на одну серию ФСО. Каждый экземпляр ФСО сопровождают паспортом (Приложение Б) и инструкцией по применению (Приложение В).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате научного анализа современного состояния проблемы оценки специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ показана необходимость совершенствования методики на основе РТГА и разработки унифицированной методики на основе ИФА с применением ФСО. На момент начала наших исследований стандарт содержания антител IgG человека к вирусу КЭ в РФ и за рубежом отсутствовал. Его получение, аттестация и использование в целях стандартизации и расширения номенклатуры методов оценки специфической активности явилось предметом исследования в настоящей работе.

Обоснован способ получения ФСО, заключающийся в стабилизации раствора иммуноглобулина, произведенного из иммунной плазмы крови доноров, *l*-пролином и глицином в количестве по 12,5 г/л, корректировке рН до $5,0 \pm 0,5$, стерильном розливе при непрерывном перемешивании и лиофилизации, который обеспечивает близость состава и свойств ФСО контролируемым препаратам, внутрисерийную однородность и стабильность аттестованного значения на протяжении 3 лет (с возможностью продления срока годности по данным мониторинга стабильности).

Проведена межлабораторная аттестация ФСО двумя методами. За аттестованное значение в РТГА принята медиана результатов, за неопределенность – доверительный интервал медианы при $P = 95 \%$. Получены аттестуемые характеристики трех экспериментальных серий ФСО – 1:80 (1:80 – 1:160), 1:160 (1:80 – 1:160), 1:320 (1:160 – 1:320).

При отсутствии первичного (международного) стандарта предложен алгоритм определения аттестуемой характеристики ФСО в ИФА, заключающийся в построении калибровочных кривых; проверке их линейности ($R^2 > 0,95$) и адекватности ($F_{\text{калибр}} \leq F_{\text{табл.}}$); расчете коэффициентов активности и их стандартного отклонения (s). За нижнюю границу неопределенности принята величина обратного титра вируснейтрализующих антител, установленного в

результате биологической стандартизации ФСО. Аттестованное значение и верхняя граница неопределенности рассчитана с учетом $2s$. Относительно первой экспериментальной серии аттестованы два повторных выпуска ФСО методом параллельных линий. В результате получены аттестуемые характеристики трех экспериментальных серий, составившие (248 ± 48) ЕД/мл, (297 ± 61) ЕД/мл и (360 ± 75) ЕД/мл.

Усовершенствована методика определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ на основе РТГА. Для расчета содержания антител введен коэффициент, учитывающий смещение фактического титра антител в стандарте относительно его аттестованного значения. Благодаря использованию ФСО достигнута статистическая эквивалентность результатов, полученных разными специалистами, и повышена точность определения специфической активности. Доказана правильность методики и установлено отсутствие разброса значений титра антител при оценке прецизионности.

Разработана методика определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ в ИФА. Концентрация IgG к вирусу КЭ в препарате рассчитана по отношению к активности ФСО в точке со значением ОП 0,5, что позволяет унифицировать результаты, полученные с использованием разных наборов реагентов для ИФА, и упростить вычисления. Доказана эквивалентность данных разработанной математической модели и референсного метода параллельных линий. Установлены специфичность и линейность методики, прецизионность подтверждена коэффициентом вариации, не превышающим 15 %, правильность характеризуется смещением среднего значения относительно аттестованного – от минус 3,6 до 1,6 %.

С использованием разработанного ФСО определена специфическая активность 68 серий лекарственных препаратов иммуноглобулина человека против КЭ. По данным РТГА преобладают препараты с титром антител 1:160 и 1:320. Впервые иммуноглобулины человека против КЭ охарактеризованы по концентрации IgG в ИФА, которая составляет от 223 до 649 ЕД/мл. Установлено

соответствие результатов ИФА данным РТГА, что позволяет осуществлять перевод концентрации IgG, выраженной в ЕД/мл, в титры антител.

В результате экономического обоснования показано, что применение ФСО является эффективным, поскольку значительно снижает затраты на производство лекарственного препарата, связанные с риском выбраковки серии по показателю качества «специфическая активность».

По результатам выполненных исследований разработана нормативно-технологическая документация на ФСО: инструкция по изготовлению, контролю и аттестации, проекты паспорта и инструкции по применению, что дает возможность осуществлять серийный выпуск стандарта.

Практические рекомендации. ФСО содержания антител IgG человека к вирусу КЭ разработан для специалистов, занимающихся фармацевтической разработкой, промышленным производством, контролем, экспертизой качества и государственной регистрацией препаратов иммуноглобулина человека против КЭ, и рекомендован к использованию для определения специфической активности указанных лекарственных средств.

Перспективы дальнейшей разработки темы. ФСО может быть использован при разработке методики определения специфической активности донорской плазмы на основе ИФА. Это позволит осуществлять отбор иммунного сырья для производства иммуноглобулина человека против КЭ по концентрации IgG, выраженной в ЕД/мл.

Применение ФСО возможно для калибровки внутренних стандартов соответствующих иммуноферментных тест-систем, при эпидемиологическом мониторинге с целью определения иммунного статуса населения, проживающего на эндемичных по данному инфекционному заболеванию территориях, а также в научных исследованиях для оценки защитного уровня антител, эффективности вакцин против КЭ и актуализации сроков ревакцинации.

ВЫВОДЫ

1. Разработанный способ получения ФСО, заключающийся в стабилизации раствора иммуноглобулина человека против КЭ *l*-пролином и глицином в количестве по 12,5 г/л, корректировке рН до $5,0 \pm 0,5$, стерильном розливе при непрерывном перемешивании и лиофилизации, позволяет осуществлять выпуск целевого продукта, характеризующегося близостью состава и свойств контролируемым препаратам, внутрисерийной однородностью (погрешность от неоднородности не выше 3 %) и постоянством аттестованного значения в течение 3 лет.

2. Аттестуемые характеристики ФСО трех экспериментальных серий составили 1:80, 1:160 и 1:320 с неопределенностью не более шага двукратного разведения в РТГА, а также (248 ± 48) ЕД/мл, (297 ± 61) ЕД/мл и (360 ± 75) ЕД/мл в ИФА.

3. Усовершенствованная методика определения специфической активности иммуноглобулина человека против КЭ на основе РТГА, предусматривающая модификацию способа обработки данных и использование ФСО, позволяет повысить точность определения титра антител к вирусу КЭ за счет снижения вариабельности результатов.

4. Разработанная методика определения специфической активности на основе метода ИФА, предусматривающая обработку линий регрессии стандарта и исследуемого препарата вблизи точки с оптической плотностью 0,5, обеспечивает унификацию результатов определения содержания IgG к вирусу КЭ, полученных с использованием разных тест-систем.

5. Полученные с применением разработанного ФСО результаты оценки специфической активности свидетельствуют о том, что на территории РФ преобладают лекарственные препараты иммуноглобулина человека против КЭ с титром антител 1:160 и 1:320, что соответствует концентрации IgG к вирусу КЭ от 270 до 650 ЕД/мл по данным ИФА.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВИЧ	вирус иммунодефицита человека	
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения	
ГФ-ВЭЖХ	гель-фильтрационная жидкостная хроматография	высокоэффективная
ЕФ	Европейская Фармакопея	
ИФА	иммуноферментный анализ	
КЭ	клещевой энцефалит	
ОП	оптическая плотность	
РН	реакция нейтрализации	
РТГА	реакция торможения гемагглютинации	
РФ	Российская Федерация	
ФСО	фармакопейный стандартный образец	
СПЭВ культура клеток	культура клеток почки эмбриона свиньи	
IgG	иммуноглобулин класса G	
in house метод	разработанный способ определения концентрации IgG к вирусу клещевого энцефалита в иммуноферментном анализе	
gE	(англ. glycoprotein E) гликопротеин E	
HBsAg	(англ. Hepatitis B surface antigen) поверхностный антиген вируса гепатита B	
mAbs	(англ. monoclonal antibodies) моноклональные антитела	
PLA	(англ. parallel-line assay) метод параллельных линий	
АО «НПО «Микроген»	Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген»	
ГБУЗ СО «ОСПК»	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Областная станция переливания крови»	
ГБУЗ «ЧОСПК»	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Челябинская областная станция переливания крови»	

ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)	Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации
ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови» Федерального медико-биологического агентства
NIBSC	(англ. National Institute for Biological Standards and Control) Национальный Институт стандартизации и контроля иммунобиологических лекарственных препаратов, Великобритания

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова Е.Г. Совершенствование биотехнологии производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина : автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.01.06 / Абрамова Елена Геннадьевна. – Оболенск, 2018. – 50 с.
2. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств / Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина, В.И. Климов [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2016. – Т. 16, № 4. – С. 229-236.
3. Алсынбаев, М.М. Стабилизаторы и осмолярность препаратов внутривенных иммуноглобулинов. Необходимость оценки конечной лекарственной формы при назначении внутривенного иммуноглобулина / М.М. Алсынбаев, А.Г. Ибрафилов, Е.В. Мостовская // Иммунология. – 2004. – Т. 3. – С. 177-182.
4. Анализ потребностей в стандартных образцах, предназначенных для оценки качества биологических лекарственных средств / В.И. Климов, Е.И. Саканян, Р.А. Волкова [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2017. – Т. 17, № 2. – С. 87-94.
5. Анализ специфической активности препаратов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита / Е.С. Кормщикова, К.А. Воробьев, И.В. Парамонов, Э.Ю. Кудашева // Актуальные вопросы трансфузиологии, онкогематологии и клеточной терапии: сб. материалов междунар. научн.-практ. конф. – Киров: ООО «Флат-Принт», 2021. – С. 37 – 39.
6. Валидация аналитических методик: ОФС.1.1.0012.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Т. I [Электронный ресурс]. URL: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/275/index.html (дата обращения: 28.06.2021).
7. Влияние различий в третьем домене гликопротеина E вируса клещевого энцефалита дальневосточного, сибирского и европейского субтипов на связывание рекомбинантных белков D3 с химерным антителом / И.К. Байков,

- А.Л. Матвеев, Л.А. Емельянова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23, № 3. – С. 256-261.
8. Волкова, Р.А. Проблемы оценки неопределенности методик испытаний и стандартных образцов иммунобиологических лекарственных средств / Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2017. – Т. 17, №. – С. 27-31.
 9. Воробьева, М.С. Вакцины, иммуноглобулины и тест-системы для профилактики и диагностики клещевого энцефалита / М.С. Воробьева, М.Н. Расщепкина, И.П. Ладыженская // Вопросы вирусологии. – 2007. – Т. 6. – С. 30-36.
 10. Выявление специфических иммуноглобулинов класса g в препарате Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита методом ИФА / И.П. Ладыженская, М.С. Воробьева, К.А. Саркисян [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2013. – № 3(47). – С. 26-35.
 11. Гланц, С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
 12. ГОСТ 8.315–2019 Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения. – М.: Изд-во стандартов, 2019. – 34 с.
 13. ГОСТ 8.532–2002 Стандартные образцы состава монолитных и дисперсных материалов. Межлабораторная метрологическая аттестация. – М.: Изд-во стандартов, 2003. – 9 с.
 14. ГОСТ 8.531–2002 Стандартные образцы состава монолитных и дисперсных материалов. Способы оценивания однородности. – М.: Изд-во стандартов, 2002. – 15 с.
 15. ГОСТ Р ИСО 11095–2007 (ISO 11095 – 2007, IDT) Линейная калибровка с использованием образцов сравнения. – М.: Стандартиформ, 2012. – 36 с.
 16. ГОСТ Р ИСО 16269–7–2004 (ISO Guide 16269-7 – 2001, IDT) Статистическое представление данных. Медиана. Определение точечной оценки и доверительных интервалов. – М.: Изд-во стандартов, 2004. – 15 с.

17. Государственный реестр медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий [Электронный ресурс]. URL: <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (дата обращения: 28.06.2021).
18. Ефимова, А.Р. Эпидемиологические аспекты и экстренная профилактика инфекций, передающихся клещами, в Кемеровской области / А.Р. Ефимова, О.М. Дроздова // Медицинский альманах. – 2018. – № 4(55). – С. 50-52.
19. Жибурт, Е.Б. Пути повышения качества отечественных препаратов крови / Е. Б. Жибурт // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. – 2005. – № 4. – С. 42-44.
20. Захарычева, Т.А. Клещевой энцефалит в Хабаровском крае: течение и исходы при использовании с лечебной и профилактической целью препаратов антител : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.13 / Захарычева Татьяна Адольфовна. – Пермь, 2002. – 35 с.
21. Изучение диагностического потенциала различных областей гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита / А.П. Обрядина, Ю.Е. Загрядская, Н.В. Савельева [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2008. – № 1. – С. 36-38.
22. Иммунобиологическая характеристика нового отечественного иммуноглобулинового препарата «Биогам» / А.М. Николаева, А.В. Иванов, Т.В. Вязникова [и др.] // Перспективы развития производства и применения иммунобиологических препаратов в XXI веке. Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 120-летию филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь. «Пермское Научно-производственное объединение «Биомед». – 2018. – С. 238-245.
23. Иммуноглобулин человека: ОФС 1.8.1.0003.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд., Т. II [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/1271/> (дата обращения: 28.06.2021).

24. Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита: Промышленный регламент на производство препарата № 01966992–04–05 [Текст]. – Утв. директором ФГУ «КНИИГиПК Росздрава» 10.01.06.
25. Иммуноэлектрофорез в агаровом геле: ОФС.1.8.2.0002.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд., Т. 2 [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/1317/> (дата обращения: 29.06.2021).
26. Инструкция по медицинскому применению Иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита РУ № ЛП-003446.
27. Инструкция по медицинскому применению Иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита РУ № ЛС-001279.
28. Инструкция по медицинскому применению Иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита РУ № Р N002722/01.
29. Инструкция по применению набора реагентов «Диагностикум клещевого энцефалита сухой для РТГА, РСК, РРГ», утв. Приказом Росздравнадзора от 04.04.2013 № 1220-Пр/13, 16 с.
30. Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления и количественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу клещевого энцефалита (ВектоВКЭ-IgG). АО «Вектор-Бест», утв. 21.02.2017, 27 с.
31. Инструкция по применению набора реагентов для определения антител IgG к вирусу клещевого энцефалита (Anti-TBE Virus ELISA). EuroimmunAG, 6 с.
32. Инструкция по применению набора реагентов для определения IgG-антител к вирусу клещевого энцефалита в сыворотке, плазме и цереброспинальной жидкости человека (TBEV / FSME IgG ELISA), V2020_02. IBL International GmbH, 8 с.
33. Инструкция по применению набора реагентов «ДС-ИФА-Анти-ВКЭ-Г». Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса G к вирусу клещевого энцефалита. ООО «Диагностические системы», 12 с.

34. Инструкция по применению набора реагентов Serion ELISA classic FSME / TBEVirus IgG, version V 112.17. Institut Virion\Serion GmbH, 25 с.
35. Качество исходной плазмы - основа эффективности производства препаратов донорской крови / Э.Ю. Кудашева, В.Б. Иванов, И.В. Борисевич [и др.] // Медицинская иммунология. – 2015. – № 5, Т. 17. – С. 401.
36. Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных: ОФС.1.8.2.0010.18 // Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/1385/> (дата обращения: 29.06.2021).
37. Комплексная оценка влияния специфических антител на инфекционную активность вируса клещевого энцефалита / Г.Н. Леонова, О.С. Майстровская, В.А. Лубова, Н.М. Санина // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9, № 3-4. – С. 559-567.
38. Корнилова О.Г. Теоретическое и экспериментальное обоснование подходов к обеспечению специфической безопасности и стандартизации лекарственных препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека : дис. ... д-ра фарм. наук : 14.02.02 / Корнилова Ольга Геннадьевна. – М., 2020. – 274 с.
39. Кривых, М.А. Разработка стандартного образца для определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулина человека для внутривенного введения : автореф. дис. ... канд. фарм. наук : 14.04.02 / Кривых Максим Андреевич. – М., 2017. – 24 с.
40. Крылова, Н.В. Противовирусная активность препаратов с различным механизмом действия при экспериментальном клещевом энцефалите / Н.В. Крылова, Г.Н. Леонова // Вопросы вирусологии. – 2016. – Т. 61, № 3. – С. 139-144.
41. Кудашева, Э.Ю. Совершенствование методологических основ стандартизации и медицинского применения иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных из плазмы крови человека : автореф.

- дис. ... д-ра мед. наук : 14.03.09 / Кудашева Эльвира Юрьевна. – М., 2020. – 47 с.
42. Леонова, Г.Н. Значение уровня концентрации специфических антител в элиминации разных штаммов вируса клещевого энцефалита / Г.Н. Леонова, В.А. Лубова, А.В. Калинин // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2017. – № 2(93). – С. 50-55.
43. Леонова, Г.Н. Механизмы защитного действия специфических антител по отношению к вирусу клещевого энцефалита / Г.Н. Леонова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – № 5. – С. 587-591.
44. Леонтьев, Д.А. Система вторичных стандартных образцов в лабораториях контроля качества лекарственных средств / Д.А. Леонтьев // Ведомости НЦЭСМП. – 2016. – № 1. – С. 50-55.
45. Макарова, Н.В. Статистика в Excel: Учеб. пособие / Н.В. Макарова, В.Я. Трофимец. – М.: Финансы и статистика, 2002. – 368 с.
46. Мальцева, О.В. Разработка технологии получения и изучение свойств иммуноглобулина против клещевого энцефалита для внутривенного введения : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.04 / Мальцева Ольга Валерьевна. – Киров, 2002. – 128 с.
47. Матвеев, А.Л. Протективное химерное антитело против вируса клещевого энцефалита: получение и характеристика : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.03 / Матвеев Андрей Леонидович. – Новосибирск, 2019. – 23 с.
48. О метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения: Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20.03.2020 № 202. Доступ из справочно-правовой системы «КонсультантПлюс» (дата обращения: 28.06.2021).
49. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году: Государственный доклад. М.:

- Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018. – 268 с.
50. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2019. – 254 с.
 51. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020. – 299 с.
 52. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. – 256 с.
 53. О руководстве по асептическим процессам в фармацевтическом производстве: Рекомендация коллегии Евразийской экономической комиссии от 01.03.2021 № 6. Доступ из справочно-правовой системы «Консультант Плюс» (дата обращения: 28.06.2021).
 54. Об обеспечении единства измерений: Федеральный закон от 26.06.2008 N 102-ФЗ (с изменениями от 11.06.2021). Доступ из справочно-правовой системы «Консультант Плюс» (дата обращения: 28.06.2021).
 55. Об обращении лекарственных средств: Федеральный закон от 12.04.2010 N 61-ФЗ (ред. от 22.12.2020, с изм. и доп., вступ. в силу 01.01.2021). Доступ из справочно-правовой системы «Консультант Плюс» (дата обращения: 28.06.2021).
 56. Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения: распоряжение Правительства РФ от 12.10.2019 N 2406-р, в ред. распоряжений Правительства РФ от 26.04.2020 N 1142-р, от 12.10.2020 N 2626-р, от

- 23.11.2020 N 3073–р. Доступ из справочно-правовой системы «Консультант Плюс» (дата обращения: 28.06.2021).
57. Об утверждении правил надлежащей производственной практики: Приказ Минпромторга России № 916 от 14.06.2013. Доступ из справочно-правовой системы «Консультант Плюс» (дата обращения: 28.06.2021).
58. Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686–21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»: Постановление главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 N 4. Доступ из справочно-правовой системы «Консультант Плюс» (дата обращения: 28.06.2021).
59. Об утверждении стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года и плана ее реализации: приказ Минздрава России от 13.02.2013 N 66. Доступ из справочно-правовой системы «Консультант Плюс» (дата обращения: 28.06.2021).
60. Оловникова, Н.И. Иммунопрофилактика реэус-иммунизации: перспектива создания моноклонального иммуноглобулина для предупреждения гемолитической болезни новорождённых / Н.И. Оловникова, Т.Л. Николаева, М.А. Эршлер // Иммунология. – 2018. – № 39 (1). – С. 74-80.
61. Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов ВЭЖХ: ОФС.1.8.2.0006.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд., Т. II [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/1355/> (дата обращения: 29.06.2021).
62. Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на плёнках из ацетата целлюлозы: ОФС.1.8.2.0009.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд., Т. II [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/1381/> (дата обращения: 29.06.2021).
63. 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 // Биотехнология. – 2011. – № 5. – С. 80-84.
64. Опыт изучения экстренной профилактики и лечения клещевого энцефалита специфическим иммуноглобулином человека / Ю.В. Олефир, В.А. Меркулов, М.С. Воробьева [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 8 (часть 2). – С. 162-170.
65. Особенности экологии вируса клещевого энцефалита европейского субтипа на территории Сибири / И.В. Козлова, С.Е. Ткачев, Ю.С. Савинова [и др.] // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2017. – № 1(92). – С. 22-25.
66. Отечественный препарат иммуноглобулина человека для экстренной профилактики и лечения клещевого энцефалита / Ю.В. Олефир, В.А. Меркулов, М.С. Воробьева [и др.] // Иммунология. – 2015. – № 6. – С. 353-357.
67. Оценка стабильности аналитической работы методики определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека / О.Г. Корнилова, Е.А. Хуснатдинова, Е.С. Коновалова, Р.А. Волкова // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2019. – Т. 19, № 2. – С. 118-123.
68. Парамонов, И.В. Опыт внедрения системы утверждения доноров плазмы для фракционирования / И.В. Парамонов, А.Л. Попцов, А.В. Рылов // Гематология и трансфузиология. – 2016. – №2. – С. 87-91.
69. Парамонов, И.В. Система обеспечения качества и инфекционной безопасности плазмы для фракционирования в условиях её массовой заготовки : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.01.21 / Парамонов Игорь Владимирович. – Киров, 2017. – 48 с.
70. Патент 2302427, Российская Федерация, МПК: СО 7 К 16/06 (2006.01), А61К 39/395 (2006.01), А61Р 37/00 (2006.01). Способ получения препарата иммуноглобулина для внутривенного введения и препарат, получаемый этим

- способом (варианты) / Лютов А.Г.; патентообладатели Лютов Андрей Германович, Решетник Вячеслав Викторович. № 2005115752/13; заявл. 24.05.2005; опубл. 10.07.2007, Бюл. №19. 11 с.
71. Пеньевская, Н.А. Экстренная профилактика клещевого энцефалита с помощью гомологичного специфического иммуноглобулина: теория и практика / Н.А. Пеньевская, В.И. Злобин // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2013. – Т. 70, № 3. – С. 81-89.
72. Пеньевская, Н. А. Этиотропные препараты для экстренной профилактики клещевого энцефалита: перспективные разработки и проблемы эпидемиологической оценки эффективности / Н.А. Пеньевская // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2010. – № 1(50). – С. 39-45.
73. Песков, А. С. Роль Хабаровского НИИ Эпидимиологии и Микробиологии и филиала ФГУН НПО «Микроген» Хабаровского предприятия по производству бакпрепаратов в разработке и совершенствовании донорских специфических иммуноглобулинов против клещевого энцефалита / А. С Песков, Г. М. Воронкова // Дальневосточный Журнал Инфекционной патологии. – 2007. – № 11. – С. 27-46.
74. Подольский, М.В. Высушивание препаратов крови и кровезаменителей / М.В. Подольский. – Москва: Медицина, 1973. – 192 с.
75. Попцов, А. Л. Значение индикации ДНК парвовируса В19 в обеспечении инфекционной безопасности плазмы для фракционирования : дисс. ... канд. мед. наук : 14.01.21 / Попцов Александр Леонидович. – Киров, 2015. – 87 с.
76. Потеря в массе при высушивании: ОФС.1.2.1.0010.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд. Т. I [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v13/vol1/#556> (дата обращения: 29.06.2021).
77. Препараты иммуноглобулинов человека специфические для лечения и профилактики инфекционных заболеваний / И.В. Борисевич, Э.Ю. Кудашева, В.Б. Иванов, Е.В. Лебединская // Иммунология. – 2017. – Т. 38, № 6. – С. 320-326.

78. Применение ультрафильтрации для концентрирования и очистки антигенов / А.В. Комиссаров, Ю.А. Алешина, О.В. Громова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – № 1. – С. 79-84.
79. Разработка методов диагностики, прогноза и сопроводительной терапии при заболеваниях системы крови. Часть 9. Получение иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита для внутривенного введения сухого: отчет о НИР (заключ.) / ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России; рук. Шарыгин С.Л.; исполн.: Дробкова А.В., Куноф В.К., Мальцева О.В. [и др.]. Киров, 2010. 98 с. Библиогр.: с. 86-98. УДК 616.15-06-07-08, № госрегистрации 01200604343.
80. Разработка отраслевого стандартного образца специфической активности эритропоэтина / А.К. Яковлев, Р.А. Волкова, Л.В. Симутенко [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52, № 1. – С. 60-64.
81. Растворимость: ОФС.1.2.1.0005.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд. Т.1 [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.ruscml.ru/feml/pharma/v13/vol1/#530> (дата обращения 29.06.2021).
82. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
83. Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств: Решение коллегии Евразийской экономической комиссии № 113 от 17.07.2018. Доступ из справочно-правовой системы «КонсультантПлюс» (дата обращения: 28.06.2021).
84. Современные подходы к разработке стандартных образцов для оценки качества фармацевтических субстанций / В.А. Меркулов, Е.И. Саканян, В.И. Климов [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49, № 11. – С. 54-56.
85. Современные подходы к экстренной специфической профилактике клещевого энцефалита / И.В. Козлова, В.И. Злобин, М.М. Верхозина [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2007. – Т. 52, № 6. – С. 25-30.

86. Современные проблемы стандартных образцов лекарственных средств в Российской Федерации / Р.А. Волкова, О. В. Фадейкина, О.Б. Устинникова [и др.] // Фармация. – 2020. – Т. 69, № 2. – С. 5-11.
87. Состояние проблемы стандартизации специфических иммуноглобулинов и антитоксических сывороток / И.В. Борисевич, Э.Ю. Кудашева, О.В. Перельгина [и др.] // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, № 5. – С. 379.
88. Сравнительный анализ результатов количественного определения содержания антител IgG к вирусу клещевого энцефалита с использованием различных иммуноферментных тест-систем / Е.С. Кормщикова, И.В. Парамонов, А.В. Рылов, Э.Ю. Кудашева // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19, № 5. – С. 255-256.
89. Стандартные образцы: ОФС.1.1.0007.18 // Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд., Т. I [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol1/185/> (дата обращения: 29.06.2021).
90. Стерильность: ОФС.1.2.4.0003.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд., Т. I [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v13/vol1/#924> (дата обращения: 29.06.2021).
91. Тенденции развития эпидемического процесса клещевого вирусного энцефалита в Российской Федерации, лабораторная диагностика, профилактика и прогноз на 2021 г. / Е.И. Андаев, А.Я. Никитин, Е.В. Яцменко [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2021. – № 1. – С. 6-16.
92. Технологические аспекты обеспечения вирусной безопасности препаратов иммуноглобулинов человека / Э.Ю. Кудашева, И.В. Борисевич, В.П. Бондарев, А.Н. Миронов // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, № 5. – С. 400.
93. Топычанова, Н.Г. Офицеров К вопросу о сроках ревакцинации против клещевого энцефалита / Н.Г. Топычанова, И.Н. Кувшинова, В.И. Офицеров // НОВОСТИ «Вектор-Бест». – 2015. – № 2 (76). – С. 3-6

94. Фадейкина, О.В. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств / О.В. Фадейкина, Р.А. Волкова // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т. 51, № 8. – С. 44-50.
95. Фармакопейные стандартные образцы и практика их применения в отечественной системе стандартизации лекарственных средств / В.А. Меркулов, Е.И. Саканян, Р.А. Волкова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 50, № 4. – С. 40-43.
96. Эволюция клещевого энцефалита за 80-летний период: основные проявления, вероятные причины / Н.М. Колясникова, С.Г. Герасимов, А.А. Ишмухаметов, В.В. Погодина // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2020. – Т. 19, № 3. – С. 78-88.
97. Экспериментальное изучение эффективности удаления вирусов гепатитов В, С и парвовируса В19 при фракционировании плазмы крови этиловым спиртом / Н.В. Зубкова, М.М. Кузнецова, С.В. Зубов [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2016. – Т. 16, № 1. – С. 43-48.
98. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации в 2019 г. и прогноз на 2020 г / А.Я. Никитин, Е.И. Андаев, Е.В. Яцменко [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – Т. 1. – С. 33-42.
99. Эффективность специфической профилактики клещевого энцефалита / М.С. Щербинина, О.А. Бархалева, О.С. Дорохова, А.А. Мовсесянц // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2020. – Т. 20, № 3. – С. 174-186.
100. A comparative analysis on the physicochemical properties of tick-borne encephalitis virus envelope protein residues that affect its antigenic properties / Y.S. Bukin, Y.P. Dzhioev, S.E. Tkachev [et al.] // Virus Res. – 2017. – V. 15, N 238. – P. 124-132.

101. An evaluation of serological methods to diagnose tick-borne encephalitis from serum and cerebrospinal fluid / C. Reusken, M. Boonstra, S. Rugebregt [et al.] // *J Clin Virol.* – 2019. – V. 120. – P. 78-83.
102. Antibody prophylaxis and therapy for flavivirus encephalitis infections / J.T. Roehrig, L.A. Staudinger, A.R. Hunt [et al.] // *Ann N Y Acad Sci.* – 2001. – V. 951. – P. 286-297.
103. Antibody with an engineered Fc region as a therapeutic agent against dengue virus infection / R. Ramadhany, I. Hirai, T. Sasaki [et al.] // *Antiviral Res.* – 2015. – V. 124. – P. 61-68.
104. A rapid fluorescent focus inhibition test for detection of neutralizing antibodies to tick-borne encephalitis virus / S. Vene, M. Haglund, O. Vapalahti, A. Lundkvist // *J Virol Methods.* – 1998. – V. 73, N 1. – P. 71-75.
105. Arras, C. Do specific hyperimmunoglobulins aggravate clinical course of tick-borne encephalitis? / C. Arras, R. Fescharek, J. P. Gregersen // *The Lancet.* – 1996. – V. 347, N 9011. – P. 1331
106. Austin, S.K. B cell response and mechanisms of antibody protection to West Nile virus / S.K. Austin, K.A. Dowd // *Viruses.* – 2014. – V. 3, N 6(3). – P. 1015-1036.
107. Bergström, J.J. Epitope-Specific Suppression of IgG Responses by Passively Administered Specific IgG: Evidence of Epitope Masking / J.J. Bergstrom, H.Xu, B. Heyman // *Front Immunol.* – 2017. – V. 6, N 8. – P. 238-249.
108. Borg, A-L. Investigation of a Method for Determination of Anticomplementary Activity (ACA) in Octagam: Master's Thesis: LITH-IFM-EX-09/2207-SE / Borg Ann-Louise. – Stockholm, 2009. – 57 p.
109. Bournazos, S. The role of Fc-FcγR interactions in IgG-mediated microbial neutralization / S. Bournazos, D. J. DiLillo, J. V. Ravetch // *J Exp Med.* – 2015. – V. 24, N 212(9). – P. 1361-1369.
110. Broker, M. After a tick bite in a tick-borne encephalitis virus endemic area: current positions about post-exposure treatment / M. Broker, H. Kollaritsch // *Vaccine.* – 2008. – V. 13, N 26(7). – P.863-868.

111. Characterization of neutralizing monoclonal antibody against tick-borne encephalitis virus in vivo / A. Matveev, L. Matveev, O. Stronin [et al.] // *Vaccine*. – 2020. – V. 2, N 38(27). – P. 4309-4315.
112. Comparison of Four Commercial IgG-Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Detection of Tick-Borne Encephalitis Virus Antibodies / R. Ackermann-Gaumann, C. Eyer, S. L. Leib, C. Niederhauser // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2019. – V. 19, N 5. – P. 358-364.
113. Comparison of six commercial tick-borne encephalitis IgM and IgG ELISA kits and the molecular characterization of their antigenic design / A. Velay, M. Solis, H. Barth [et al.] // *Diagn Microbiol Infect Dis.* – 2018. – V.90, N 4. – P. 286-292.
114. Comparison of three commercial IgG and IgM ELISA kits for the detection of tick-borne encephalitis virus antibodies / R. Ackermann-Gaumann, M.L. Tritten, M. Hassan, R. Lienhard // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2018. – V. 9, N 4. – P. 956-962.
115. Correlation between ELISA, hemagglutination inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis / H. Holzmann, M. Kundi, K. Stiasny [et al.] // *J Med Virol.* – 1996. – V. 48, N 1. – P. 102-107.
116. Cryptic properties of a cluster of dominant flavivirus cross-reactive antigenic sites / K. Stiasny, S. Kiermayr, H. Holzmann, F.X. Heinz // *J Virol.* – 2006. – V. 80, N 19. – P. 9557-9568.
117. Dowd, K.A. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view / K.A. Dowd, T. C. Pierson // *Virology*. – 2011. – V. 15, N 411(2). – P. 306-315.
118. European Patent Application 1 532 983 A1, Int Cl.: A61K 39/395, A61K 47/18. Immunoglobulin preparations having increased stability / Weiss, Wolfgang, Dipl.-Chem. Dr. et al. Weickmann & Weickmann; Applicant: ZLB Bioplasma AG. Application number: 03026539.14; Date of filing: 18.11.2003; Date of publication: 25.05.2005, Bulletin 2005/21.
119. Evaluation of different serological diagnostic methods for tick-borne encephalitis virus: enzyme-linked immunosorbent, immunofluorescence, and neutralization

- assay / N. Litzba, H. Zelená, T. R. Kreil [et al.] // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2014. – V. 14, N 2. – P. 149-159.
120. Experimental Evaluation of the Protective Efficacy of Tick-Borne Encephalitis (TBE) Vaccines Based on European and Far-Eastern TBEV Strains in Mice and in Vitro / L.L. Chernokhaeva, Y.V. Rogova, L.I. Kozlovskaya [et al.] // *Front Microbiol.* – 2018. – V. 9. – P. 1487.
121. Fc receptors and their influence on efficacy of therapeutic antibodies for treatment of viral diseases / K.R. Chan, E.Z. Ong, D.Z. Mok, E.E. Ooi // *Expert Rev Anti Infect Ther.* – 2015. – V. 13, N 11. – P. 1351-1360.
122. Gelfand, E.W. Differences between IGIV products: impact on clinical outcome / E. W. Gelfand // *Int Immunopharmacol.* – 2006. – V. 6, N 4. – P. 592-599.
123. Heinz, F.X. The entry machinery of flaviviruses / F.X. Heinz, K. Stiasny, S.L. Allison // *Arch Virol Suppl.* – 2004. – N 18. – P. 133-137.
124. Holzmann, H. Diagnosis of tick-borne encephalitis / H. Holzmann // *Vaccine.* – 2003. – N 21. – P. S36-40.
125. Hofmann, H. ELISA for IgM and IgG antibodies against tick-borne encephalitis virus: quantification and standardization of results / H. Hofmann, F.X. Heinz, H. Dippe // *Zentralbl Bakteriolog Mikrobiol Hyg A.* – 1983. – V. 255, N 4. – P. 448-455.
126. Humoral immunity and correlation between ELISA, hemagglutination inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis virus in children / G. Venturi, R. Mel, A. Marchi [et al.] // *J Virol Methods.* – 2006. – V. 134, N 1-2. – P. 136-139.
127. Immune globulin subcutaneous, human 20% solution (Xembify®), a new high concentration immunoglobulin product for subcutaneous administration / W. Alonso, P. Vandenberg, J. Lang [et al.] // *Biologicals.* – 2020. – V. 64. – P. 34-40.
128. Immunogenicity and safety of the tick-borne encephalitis vaccination (2009-2019): A systematic review / J.E. Rampa, H.H. Askling, P. Lang [et al.] // *Travel Med Infect Dis.* – 2020. – V. 37. – P. 101876.

129. Keeler, S.P. Requirement of Fc-Fc Gamma Receptor Interaction for Antibody-Based Protection against Emerging Virus Infections / S.P. Keeler, J.M. Fox // *Viruses*. – 2021. – V. 31, N 13(6). – P. 1037.
130. Kreil, T.R. Pre- and postexposure protection by passive immunoglobulin but no enhancement of infection with a flavivirus in a mouse model / T.R. Kreil, M.M. Eibl // *J Virol*. – 1997. – V. 71, N 4. – P. 2921-2927.
131. L-Proline reduces IgG dimer content and enhances the stability of intravenous immunoglobulin (IVIg) solutions / R. Bolli, K. Woodtli, M. Bärtschi [et al.] // *Biologicals*. – 2010. – V. 38, N 1. – P. 150-157.
132. Leonova, G.N. Mechanisms of Protective Actions of Specific Antibodies against the Tick-Borne Encephalitis Virus / G.N. Leonova // *Bull Exp Biol Med*. – 2020. – V. 169, N 5. – P. 657-660.
133. Long-Term Stability and Reversible Thermal Unfolding of Antibody Structure at Low pH: Case Study / H. Fukada, K. Tsumoto, T. Arakawa, D. Ejima // *J Pharm Sci*. – 2018. – V.107, N11. – P. 2965-2967.
134. Low prevalence of tick-borne encephalitis virus antibodies in Norwegian blood donors / A. Marvik, Y. Tveten, A.B. Pedersen [et al.] // *Infect Dis (Lond)*. – 2021. – V.53, N1. – P. 44-51.
135. Marasco, W.A. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics / W.A. Marasco, J. Sui // *Nat Biotechnol*. – 2007. – V. 25, N 12. – P. 1421-1434.
136. Nimmerjahn, F. Fc-gamma receptors as regulators of immune responses / F. Nimmerjahn, J.V. Ravetch // *Nat Rev Immunol*. – 2008. – V. 8, N 1. – P. 34-47.
137. Phillipotts, R.J. Antibody-dependent enhancement of tick-borne encephalitis virus infectivity / R.J. Phillipotts, J.R. Stephenson, J.S. Porterfield // *J. Gen Virol*. – 1985. – V. 66 (Pt 8). – P. 1831-1837.
138. Pierson, T.C. A game of numbers: the stoichiometry of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection / T.C. Pierson, M.S. Diamond // *Prog Mol Biol Transl Sci*. – 2015. – V. 129. – P. 141-166.

139. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia / M. Ecker, S.L. Allison, T. Meixner, F.X. Heinz // *J. Gen Virol.* – 1999. – V. 80 (Pt. 1). – P. 179-185.
140. Slon Campos, J.L. The immune response against flaviviruses / J.L. Slon Campos, J. Mongkolsapaya, G.R. Screaton // *Nature Immunology.* – 2018. – V. 19, N 11. – P. 1189-1198.
141. Statistical analysis of results of biological assays and test: 01/2008:50300 // *European Pharmacopoeia 9.0* [Электронный ресурс]. URL: <http://online6.edqm.eu/ep900/> (дата обращения: 28.04.2020).
142. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody / T. Fuzik, P. Formanova, D. Ruzek [et al.] // *Nat Commun.* – 2018. – V. 30, N 9(1). – P. 436.
143. Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in Flavivirus Infections / X. Zhang, R. Jia, H. Shen [et al.] // *Viruses.* – 2017. – V. 13, N 9(11). – P. 338.
144. The separation of the antibodies, isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and beta1-lipoprotein into subfractions of human plasma / J.L. Oncley, M. Melin, D.A. Richert [et al.] // *J. Am Chem Soc.* – 1949. – V. 71, N 2. – P. 541-550.
145. Tick-borne encephalitis despite specific immunoglobulin prophylaxis / G. Kluger, A. Schöttler, K. Waldvogel [et al.] // *Lancet.* – 1995. – V. 2, N 346(8988). – P. 1502.
146. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines / D. Ruzek, T. AvsicZupanc, J. Borde [et al.] // *Antiviral Res.* – 2019. – V. 164. – P. 23-51.
147. Tick-borne encephalitis virus neutralization by high dose intravenous immunoglobulin / J. Elsterova, M. Palus, J. Sirmarova [et al.] // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2017. – V. 8, N 2. – P. 253-258.
148. Tick-borne encephalitis virus-neutralizing antibodies in different immunoglobulin preparations / P.O. Rabel, C.B. Planitzer, M.R. Farcet, T.R. Kreil // *Clin Vaccine Immunol.* – 2012. – V. 19, N 4. – P. 623-625.

149. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In.: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier / A.M. King, M.J. Adams, E.B. Carstens, E.J. Lefkowitz. – 2012. – P. 1003-1020.
150. Weissbach, F.H. Comparison of Two Commercial Tick-Borne Encephalitis Virus IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays / F.H. Weissbach, H.H. Hirsch // Clin Vaccine Immunol. – 2015. – V. 22, N 7. – P. 754-760.
151. WHO expert committee on biological standardization. Annex 2 Recommendation for the preparation, characterization, and establishment of international and other biological reference standards // WHO Technical Report Series. – 2006. – N 932. – P. 73-131.
152. WHO Working Group on Stability of Reference Materials for Biological Medicines and In Vitro Diagnostics // WHO Meeting Report. – 2006. – 15 p.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Федеральное медико-биологическое агентство
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«КИРОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ГЕМАТОЛОГИИ И ПЕРЕЛИВАНИЯ КРОВИ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-
БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»
(ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России)

УТВЕРЖДАЮ

Директор

ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России

д-р мед. наук



И.В. Парамонов

«12»

04

2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**по изготовлению, контролю и аттестации
фармакопейного стандартного образца содержания антител
IgG человека к вирусу клещевого энцефалита**

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

ПРОЕКТ

полное наименование производителя

сокращенное наименование производителя

Юридический адрес: _____
тел. _____, факс _____

Фактически адрес: _____
тел. _____, факс _____

ПАСПОРТ

**на научно-техническую продукцию
ФАРМАКОПЕЙНЫЙ СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ СОДЕРЖАНИЯ
АНТИТЕЛ IgG ЧЕЛОВЕКА К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА
ФСО ГФ РФ 3.1.00453**

1. НАЗНАЧЕНИЕ: для определения специфической активности человека против клещевого энцефалита методами реакции торможения гемагглютинации и иммуноферментного анализа и проверки правильности полученных результатов.

2. АТТЕСТУЕМАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА:

- титр антител к вирусу клещевого энцефалита – _____ (_____ – _____) в реакции торможения гемагглютинации;
- содержание IgG к вирусу клещевого энцефалита – _____ (_____ – _____) ЕД/мл в иммуноферментном анализе.

3. ОБЪЕМ ВОДЫ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЛИОФИЛИЗАТА: _____ мл.

4. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ:

Фармакопейный стандартный образец (ФСО) представляет собой лиофилизат антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита. 1 мл восстановленного препарата содержит _____ мг белка (_____ % гамма-глобулинов, основная фракция – IgG, ди- и мономеры – _____ %, полимеры и агрегаты – _____ %), 12,5 мг *l*-пролина, 12,5 мг глицина, 9 мг натрия хлорида.

Страна происхождения – Россия.

5. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ: в соответствии с инструкцией по применению, прилагаемой к паспорту.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

ПРОЕКТ

ИНСТРУКЦИЯ

**на научно-техническую продукцию
ФАРМАКОПЕЙНЫЙ СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ СОДЕРЖАНИЯ
АНТИТЕЛ IgG ЧЕЛОВЕКА К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА
ФСО ГФ РФ 3.1.00453**

1 ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ

1.1 Инструкция устанавливает порядок и условия применения фармакопейного стандартного образца содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита (ФСО) для определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита в реакции торможения гемагглютинации и иммуноферментном анализе с использованием наборов реагентов, зарегистрированных на территории Российской Федерации.

1.2 ФСО представляет собой аморфную массу белого цвета, равномерным слоем прилегающую к стенкам флакона. Проверку правильности маркировки и целостности флаконов проводить путем внешнего осмотра. При обнаружении повреждений флакон с ФСО следует утилизировать.

1.3 Работы с ФСО проводить с использованием поверенных и/или откалиброванных средств измерения.

2 ПОДГОТОВКА К ПРИМЕНЕНИЮ

2.2 Во флакон с лиофилизатом ФСО внести указанный в паспорте объем воды, прошедшей очистку, аккуратно перемешать вращательными движениями, выдержать не менее 15 минут при комнатной температуре для стабилизации раствора. Регидратированный (восстановленный) ФСО хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 месяца. Замораживание не допускается.

3 УСЛОВИЯ И ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

3.1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В РЕАКЦИИ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

3.1.1 Обработку ФСО проводить аналогично обработке испытуемых образцов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита согласно инструкции по применению набора реагентов «Диагностикум клещевого энцефалита сухой для РТГА, РСК, РРГ».

3.1.2 Приготовить в лунках полистиролового планшета разведения ФСО от 1:10 до 1:1280 аналогично приготовлению разведений испытуемых образцов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита.

3.1.3 Провести реакцию торможения гемагглютинации, учет результатов и определение фактического титра антител к вирусу клещевого энцефалита в образцах согласно инструкции по применению набора реагентов «Диагностикум клещевого энцефалита сухой для РТГА, РСК, РРГ».

3.1.4 Рассчитать содержание антител к вирусу клещевого энцефалита в испытуемом образце препарата (T) по формулам:

$$T = k \cdot T_{\text{обр}} \quad (1)$$

$$k = \frac{A_{\text{СО}}}{T_{\text{СО}}} \quad (2)$$

где k – коэффициент пересчета;

$A_{\text{СО}}$ – аттестованные значения ФСО в реакции торможения гемагглютинации;

$T_{\text{СО}}$ – фактический титр антител к вирусу клещевого энцефалита в ФСО, полученный в постановке;

$T_{\text{обр.}}$ – фактический титр антител к вирусу клещевого энцефалита в анализируемом образце, полученный в постановке.

3.2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

3.2.1 Приготовить предварительные разведения ФСО и испытуемых образцов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита по схеме:

Предварительное разведение	Компонент пробы	Объем компонента, мкл
1:10	ФСО/испытуемый образец иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита	10
	Раствор для предварительного разведения образцов	90
1:400	ФСО/испытуемый образец иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита в разведении 1:10	10
	Раствор для предварительного разведения образцов	390

ПРИМЕЧАНИЕ: для ФСО приготовить два независимых предварительных разведения (для расчета содержания антител к вирусу клещевого энцефалита и проверки правильности полученных результатов), для испытуемых образцов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита – одно.

3.2.2 На иммунологическом планшете для каждой пробы приготовить два ряда последовательных разведений от 1:800 до 1:6400. Во все лунки планшета внести по 100 мкл раствора для разведения образцов. В первые лунки каждого ряда последовательных разведений добавить по 100 мкл проб, приготовленных в соответствии с п.3.2.1. Переносить по 100 мкл смеси, соблюдая правила приготовления последовательных разведений.

Схема размещения проб на планшете при анализе 4 образцов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита:

	1	2	3	4	5	6
A	ФСО-1 1:800	ИГ 1 1:800	ИГ 2 1:800	ИГ 3 1:800	ИГ 4 1:800	ФСО-2 1:800
B	ФСО-1 1:1600	ИГ 1 1:1600	ИГ 2 1:1600	ИГ 3 1:1600	ИГ 4 1:1600	ФСО-2 1:1600
C	ФСО-1 1:3200	ИГ 1 1:3200	ИГ 2 1:3200	ИГ 3 1:3200	ИГ 4 1:3200	ФСО-2 1:3200
D	ФСО-1 1:6400	ИГ 1 1:6400	ИГ 2 1:6400	ИГ 3 1:6400	ИГ 4 1:6400	ФСО-2 1:6400
E	ФСО-1 1:800	ИГ 1 1:800	ИГ 2 1:800	ИГ 3 1:800	ИГ 4 1:800	ФСО-2 1:800
F	ФСО-1 1:1600	ИГ 1 1:1600	ИГ 2 1:1600	ИГ 3 1:1600	ИГ 4 1:1600	ФСО-2 1:1600
G	ФСО-1 1:3200	ИГ 1 1:3200	ИГ 2 1:3200	ИГ 3 1:3200	ИГ 4 1:3200	ФСО-2 1:3200
H	ФСО-1 1:6400	ИГ 1 1:6400	ИГ 2 1:6400	ИГ 3 1:6400	ИГ 4 1:6400	ФСО-2 1:6400

ИГ 1-4 – испытуемые образцы иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита.
 ФСО-1 – первое независимое разведение стандарта (используется для расчета содержания антител к вирусу клещевого энцефалита).
 ФСО-2 – второе независимое разведение стандарта (используется для проверки правильности результатов анализа).

3.2.3 Провести иммуноферментный анализ в соответствии с инструкцией по применению тест-системы.

3.2.4 Провести обработку результатов анализа.

3.2.4.1 Рассчитать среднее значение оптической плотности для каждого разведения каждой пробы. Ряд оптических плотностей для последовательных разведений должен содержать точку со значением 0,5.

3.2.4.2 Для каждого образца построить графики зависимости логарифма обратного разведения пробы (значения откладываются по оси Y) от логарифма среднего значения оптической плотности (значения откладываются по оси X). Использовать логарифмирование по основанию 2. Вывести уравнение линии тренда. Значение коэффициента детерминации R^2 линии тренда должно быть не менее 0,95.

3.2.4.3 Вместо x в уравнение линии тренда подставить -1 ($\log_2 0,5$). Вычислить антилогарифм полученных величин. Содержание антител к вирусу клещевого

энцефалита в испытуемом образце иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита рассчитать по формуле:

$$C_{\text{ИГ/ФСО-2}} = 2^{U_{\text{ИГ/ФСО-2}} - U_{\text{ФСО-1}}} \times A \quad (3)$$

где $C_{\text{ИГ/ФСО-2}}$ – содержание антител к вирусу клещевого энцефалита в испытуемом образце иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита / ФСО для проверки правильности результатов анализа;

$U_{\text{ИГ/ФСО-2}}$ – логарифм по основанию 2 обратного разведения испытуемого образца иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита / ФСО для проверки правильности результатов анализа, соответствующего оптической плотности 0,5;

$U_{\text{ФСО-1}}$ – логарифм по основанию 2 обратного разведения ФСО, соответствующего оптической плотности 0,5;

A – аттестованное значение ФСО в иммуноферментном анализе (ЕД/мл), указанное в паспорте.

ПРИМЕЧАНИЯ

1 Обработку результатов иммуноферментного анализа возможно проводить методом параллельных линий с использованием специализированных программ.

2 Если полученные значения оптической плотности ниже 0,5, повторить анализ с использованием меньших разведений образцов.

3 Если полученные значения оптической плотности выше 0,5, повторить анализ с использованием больших разведений образцов.

4 Если не выполняется условие $R^2 \geq 0,95$, повторить анализ с использованием других разведений или снизить кратность последовательных разведений до 1,5.

4 ПРОВЕРКА ПРАВИЛЬНОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

4.1 Значение содержания антител к вирусу клещевого энцефалита в ФСО должно находиться в пределах неопределенности аттестованного значения, указанной в паспорте на ФСО для соответствующего метода анализа.

ПРИМЕЧАНИЕ: если значение содержания антител в ФСО не соответствует диапазону неопределенности аттестованного значения, повторить анализ.

5 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

5.1 При работе с ФСО пользоваться правилами техники безопасности, действующими на предприятии.

6 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

6.1 ФСО хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте.

6.2 Транспортирование всеми видами крытого транспорта. Допускается транспортировка при температуре окружающей среды.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2735782

Способ получения стандартного образца содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства" (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2020113865

Приоритет изобретения 03 апреля 2020 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 09 ноября 2020 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 03 апреля 2040 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Иванев