Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

На правах рукописи

ШВЕДОВА ЕВГЕНИЯ ВЛАДИМИРОВНА

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИ-D АНТИТЕЛ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА АНТИРЕЗУС Rh_0(D)

3.2.7. Иммунология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:
Доктор медицинских наук
Александр Алексеевич Солдатов

Москва, 2023 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОКСОКРАЩЕНИЙ..... 4
ВВЕДЕНИЕ..... 6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... 17
Научный анализ современного состояния проблемы оценки содержания анти-D антител в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D)..... 17
1.1 Номенклатура лекарственных препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D), разрешенных к применению в Российской Федерации..... 17
1.2 Современные подходы к оценке содержания анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D)..... 24
1.3 Выбор направления совершенствования оценки содержания анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D)..... 33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... 38
2.1 Материалы исследования..... 38
2.2 Методы исследования..... 42
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ..... 45
Совершенствование методики иммуноферментного анализа количественного определения анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D)..... 45
3.1 Оценка возможности использования D-положительных эритроцитов I(0) группы крови человека фенотипа R1R1 для приготовления иммуносорбента..... 45
3.2 Изучение особенностей иммобилизации эритроцитов человека

фенотипов R1R1 и R2R2 на поверхности твердой фазы при приготовлении иммуносорбента..... 50
3.3 Разработка критериев иммобилизации эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 на поверхности твердой фазы в приготовленном иммуносорбенте..... 54
3.4 Валидация усовершенствованной методики иммуноферментного анализа количественного определения анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D)..... 60
3.5 Оценка точности и прецизионности количественного определения анти-D антител при проведении международного межлабораторного исследования подтверждения квалификации усовершенствованной методики иммуноферментного анализа..... 72
3.6 Разработка фармакопейного стандартного образца усовершенствованной методики иммуноферментного анализа количественного определения анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D)..... 78
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ..... 86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... 95
ВЫВОДЫ..... 98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... 100
ПРИЛОЖЕНИЯ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Аг - антиген

Ат - антитела

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

ГБП - гемолитическая болезнь плода

ГФ - Государственная фармакопея

ДИ - доверительный интервал

ЕАЭС - Евразийский экономический союз

ЕФ - Европейская фармакопея

ИГЧ - иммуноглобулин человека

ИФА - иммуноферментный анализ

КИО - контрольный испытуемый образец

МЕ - международная единица

МСО - международный стандартный образец

ОДВ - основное действующее вещество

ОЕ - относительная единица

ОФС - общая фармакопейная статья

СО - стандартный образец

РФ - Российская Федерация

ФБР - фосфатно-солевой буферный раствор

ФЗ - Федеральный закон

ФС - Фармакопейная статья

ФСО - Фармакопейный стандартный образец

BRP - (англ. Biological Referrence Preparation) – биологический референс-препарат

EDQM - Европейский директорат по качеству лекарственных средств

EMA - Европейское Медицинское Агентство, регуляторный орган

Европейского Союза, контролирующий качество и производство лекарственных препаратов, поступающих в обращение на территории Европейского Союза

FDA - Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, Национальный орган контроля качества пищевых продуктов и лекарственных средств в США

IgG - иммуноглобулины класса G

ICH - (англ. International Conference on Harmonisation for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) – Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для использования у человека

NIBSC - (англ. National Institute for Biological Standards and Control) – Национальный Институт стандартизации и контроля иммунобиологических лекарственных препаратов, Великобритания

PTS - (англ. Proficiency Testing Scheme) - подтверждение квалификации метода

rr - фенотип резус-отрицательных эритроцитов (Rh(+)) I(0) группы крови человека, не содержащие в своей мембране значимые резус-антигены CDE

R1R1 - фенотип резус-положительных эритроцитов (Rh(+)) I(0) группы крови человека, содержащие в своей мембране значимые резус-антигены CDe

R2R2 - фенотип резус-положительных эритроцитов (Rh(+)) I(0) группы крови человека, содержащие в своей мембране значимые резус-антигены cDE

Rh_oD - резус-антиген D

USP - (англ. U.S. Pharmacopeia) – Фармакопея США

WHO - (англ. World Health Organization) – Всемирная организация здравоохранения

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Среди иммунологически обусловленных осложнений беременности ведущее место занимает гемолитическая болезнь плода (ГБП), которая развивается вследствие резус-иммунизации - наличия в крови матери IgG антител (Ат) как проявления вторичного иммунного ответа у сенсибилизированных пациенток вследствие несовместимости крови матери и плода по антигенам (Аг) системы Резус. Среди Аг эритроцитов системы Резус наиболее иммуногенным является Аг D, способный даже в малых дозах вызывать образование иммунных Ат (анти-D Ат), которые являются причиной тяжелой ГБП. ГБН в РФ диагностируется у 0,6 % новорожденных, при этом показатели смертности остаются высокими и составляют 15-16‰. Эффективных методов медикаментозной терапии резус-иммунизации и ГБП в настоящее время не существует [22, 25].

Единственными средствами, применяемыми для специфической перинатальной профилактики резус-иммунизации, являются лекарственные препараты иммуноглобулина человека (ИГЧ) антирезус Rh_o(D) [74].

Иммунизация лекарственным препаратом ИГЧ антирезус Rh_o(D) предотвращает резус-иммунизацию более чем в 95 % случаев при условии достаточности и своевременности дозы введения препарата. При клиническом применении в мировой практике установлено, что 10 мкг (50 МЕ) анти-D Ат в лекарственном препарате ИГЧ антирезус Rh_o(D) нейтрализует 0,5 мл резус-положительных эритроцитов плода (или 1 мл цельной крови) [39].

Таким образом, выбор методов количественной оценки содержания анти-D Ат - основного действующего вещества на этапах жизненного цикла препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D), от начальной разработки до ввода в гражданский оборот, играет ключевую роль в обеспечении их безопасности и эффективности. При этом

препараты ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ относятся к группе иммунобиологических лекарственных препаратов, биофармацевтические и физико-химические свойства которых разнородны, что затрудняет применять унифицированные подходы к контролю их качества при регистрации препаратов и стандартизации.

Производители зарубежных препаратов оценивают содержание анти-D Ат в препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ в МЕ (или мкг) инструментальными методами гемагглютинации с использованием автоматизированных систем оценки результатов, проточной цитофлуориметрии и иммуноферментным методом по отношению к стандартному образцу [49].

Отечественные производители препаратов ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ определяли содержание анти-D Ат в титрах полуколичественным методом непрямой гемагглютинации с помощью непрямой пробы Кумбса без использования стандартного образца. Существенным недостатком данного метода является визуальная субъективная полуколичественная оценка результатов. Отсутствие национального стандартного образца, аттестованного в Международных единицах (МЕ) (или микрограммах (мкг)), не позволяло отечественным производителям препаратов ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ установить количественную норму содержания анти-D Ат в препарате (в МЕ (или мкг)) для расчета дозы введения в соответствии с клиническими рекомендациями Минздрава России от 2020 года «Резус иммунизация. Гемолитическая болезнь плода», ID КР596, а также международными требованиями к его клиническому применению, что могло стать причиной отсутствия требуемого терапевтического эффекта или развития нежелательных реакций [73].

В период с 2015 года по настоящее время специалисты Испытательного центра экспертизы качества иммунобиологических лекарственных средств Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской федерации (ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России) проводят исследования по совершенствованию и стандартизации оценки качества препаратов крови [30]. Однако адекватные методы количественной оценки

содержания анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ до настоящего времени не определены, не включены в структуру Государственной Фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) и не внедрены на отечественных предприятиях, производящих иммунобиологические лекарственные препараты. Национальный фармакопейный стандартный образец (ФСО) содержания анти-D Ат, обеспечивающий прослеживаемость количественного определения анти-D Ат, до настоящего времени отсутствовал [41].

Степень разработанности темы исследования

В начале 60-х годов XX века разработан и внедрен метод непрямой (пассивной) гемагглютинации (непрямая проба Кумбса) для оценки содержания анти-D-Ат IgG в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ [101].

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) было установлено, что титры анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$, полученных предложенным методом, могут варьировать в широком диапазоне (до 500 раз) [83].

Появление в 1978 году Международного стандартного образца (МСО) анти-D иммуноглобулина ВОЗ, аттестованного методом изотопной маркировки в мкг и МЕ, а также автоматизированных систем для оценки результатов реакции гемагглютинации позволило получать более воспроизводимые результаты оценки содержания анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ при параллельных постановках с использованием МСО [96].

В 1995 году предложен высокочувствительный инструментальный метод проточной цитофлуориметрии, в 2000 году впервые внедрен иммуноферментный метод для количественной оценки содержания анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$, которые наряду с методом автоматизированной гемагглютинации применяются в настоящее время в контрольно-аналитических лабораториях зарубежных стран [57, 95].

Применение метода проточной цитофлуориметрии ограничено на отечественных производствах иммунобиологических лекарственных средств в связи с высокой стоимостью оборудования, расходных материалов, необходимостью дополнительного обучения персонала [45].

Метод иммуноферментного анализа (ИФА) является доступной альтернативой реакции гемагглютинации для количественного определения анти-D Ат в отечественных лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D), а также для применения при установлении аттестуемой характеристики национального ФСО ГФ РФ для количественного определения содержания анти-D Ат в МЕ (или мкг), что позволит производителям отечественных лекарственных препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D) устанавливать значения содержания анти-D Ат в МЕ (или мкг) и будет способствовать адекватному расчету дозы введения препаратов при их клиническом применении.

ИФА основан на конкуренции биотинилированных (конъюгированных с коферментом биотином при помощи биотинил-N-гидроксисукцимида) человеческих моноклональных Ат IgG1 (получены из стабильных В-лимфобластоидных клеток, трансформированных вирусом Эпштейна-Барр; выбраны из-за их доказанной in vitro активности в стимулировании лизиса эритроцитов в антителозависимых клеточно-опосредованных анализах цитотоксичности) с анти-D Ат в препарате ИГЧ антирезус Rh_o(D) за связывание со специфическим к IgG1 эпитопом D Аг эритроцитов фенотипа R2R2, иммобилизованными на твердой фазе [55]. Отсутствие зависимости от дорогостоящего оборудования, производительность за счет использования многолуночных полистироловых планшетов делают метод наиболее приемлемым [97].

Существенными недостатками современной методики ИФА, описание которой изложено в Европейской фармакопее (ЕФ) являются ограничение использования эритроцитов только фенотипа R2R2, который менее распространен в российской популяции (14,11 %) в сравнении с фенотипом R1R1 (40,76 %), отсутствие визуальной и инструментальной оценки равномерности распределения

эритроцитов на твердой фазе, что снижает воспроизводимость метода и влияет на правильность (точность) получаемых результатов, отсутствие установленных критериев приемлемости результатов количественного определения анти-D Ат, соответствие которым обеспечивает достоверность оценки качества препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D) [15].

Таким образом, совершенствование методики ИФА количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) является актуальной научной задачей, имеющей научно-практическое значение.

Цель исследования

Усовершенствовать иммуноферментный метод количественного определения анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D).

Задачи исследования

1. Разработать способ приготовления иммуносорбента с использованием эритроцитов фенотипов R1R1 или R2R2 для количественного определения анти-D Ат в лекарственных ИГЧ антирезус Rh_o(D) методом ИФА.

2. Усовершенствовать методику количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) с помощью иммуносорбента, приготовленного с использованием эритроцитов фенотипов R1R1 или R2R2 для метода ИФА.

3. Провести валидацию усовершенствованной методики ИФА для количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D).

4. Разработать Фармакопейный стандартный образец для усовершенствованной методики количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) с помощью метода ИФА.

5. Разработать проект Общей Фармакопейной статьи «Определение антирезус Rh_o(D) антител в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D)» для Государственной Фармакопеи Российской Федерации.

Научная новизна исследования

Научная новизна диссертационной работы состоит в том, что впервые:

- использованы эритроциты фенотипа R1R1 для иммобилизации на твердой фазе при приготовлении иммуносорбента для методики ИФА;

- разработаны критерии иммобилизации эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 на твердой фазе с применением цифровой оптической микроскопии и компьютерной морфометрии с визуализацией;

- разработаны критерии оценки приемлемости результатов количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D), получаемых усовершенствованной методикой ИФА; определена программа разработки Фармакопейного стандартного образца для стандартизации количественной оценки содержания анти-D в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rho(D) с применением усовершенствованной методики ИФА;

- разработаны требования к количественной оценке анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) для внутримышечного и внутривенного введения для внедрения в ГФ РФ.

Новизна работы подтверждается выдачей Патента на изобретение № 2777845 от 11.08.2022, Российская Федерация, МПК: A61K35/12,15; G01N33/53 «Способ количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D)» авторов: Шведова Е.В., Кудашева Э.Ю., Лешина С.А., Давыдов Д.С.; заявитель и патентообладатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, заявка № 2021137704 от 20.12.2021.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость диссертационной работы состоит в усовершенствовании методики ИФА для оценки качества лекарственных препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D). Практическое значение результатов исследования заключается в их применении для оценки качества по показателю «Содержание антирезус Rh_o(D) антител» на этапах производства и обращения лекарственных препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D) в соответствии с Федеральным законом «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 № 61-ФЗ.

Внедрение в практику

Реализация подтверждена Актом внедрения результатов на Федеральном уровне научно-исследовательской работы «Разработка перспективных направлений совершенствования экспертизы качества, эффективности и безопасности биологических лекарственных препаратов и стандартизация методов оценки», регистрационным номер 121022000147-4 в ЕГИСУ НИОКТР по государственному заданию Минздрава России № ГЗ 056-00005-21-00 от 15.12. 2020 на 2021 год и на плановый период 2022 и 2023 годов (№ 056-00005-21-01 от 27.10.2021, № 056-00005-21-02 от 18.11.2021).

По результатам проведенного исследования выдан Патент на изобретение № 2777845 от 11.08.2022, Российская Федерация, МПК: A61K35/12,15; G01N33/53 «Способ количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D)»; заявитель и патентообладатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, заявка № 2021137704 от 20.12.2021.

Разработанный ФСО включен в государственный Реестр ФСО биологического происхождения ГФ РФ «Стандартный образец для определения активности иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) (содержание анти-D-антител IgG)» (ФСО 3.1.000452).

ФСО 3.2.00452 внедрен в нормативную документацию на лекарственный препарат «Иммуноглобулин человека антирезус Rh_o(D), раствор для внутримышечного введения, 150 мкг/мл (750 МЕ/мл)» производства ОБУЗ

«Ивановская станция переливания крови» (утверждено Изменение № 6 от 20.04.2022 к ФСП № ЛС-000373-180811).

Установлены требования к количественному определению анти-D Ат усовершенствованной методикой иммуноферментного анализа и методикой гемагглютинации в геле для включения в проект ОФС ГФ РФ «Определение антирезус Rh_o(D) антител иммуноглобулина G в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D)» для последующего введения в структуру ГФ РФ.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует специальности 3.2.7 - Иммунология (биологические науки). Область проведенных (изложенных в диссертации) исследований согласно пункта 6 паспорта специальности «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов».

Методология и методы исследования

В основу методологии исследования положены общенаучные принципы системного подхода, комплексность, а также анализ нормативно-правовых документов Российской Федерации, стран Европейского союза, Евразийского экономического союза, требований и рекомендаций международных регуляторных органов по оценке качества лекарственных препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D). Практическая часть работы заключалась в подборе условий для приготовления иммуносорбента с использованием эритроцитов фенотипа R1R1 или R2R2, установлении критериев иммобилизации эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 на твердой фазе, валидации усовершенствованной методики иммуноферментного анализа, в разработке ФСО «Стандартный образец для определения активности ИГЧ антирезус Rh_o(D) (содержания анти-D антител)».

Объект исследования – лекарственные препараты ИГЧ антирезус Rh_o(D).

Предмет исследования – методы оценки содержания анти-D-Ат IgG в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D).

Для решения поставленных задач использованы теоретические (сравнительный и ретроспективный анализ и синтез, формальная логика, описание и обобщение), экспериментальные методы: иммунологические (конкурентного прямого иммуноферментного анализа и гемагглютинации в геле), а также цифровая оптическая микроскопия и компьютерная морфометрия с визуализацией, параметрические и непараметрические методы описательной статистики.

Связь диссертации с планами научно-исследовательской работы ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Результаты диссертационной работы получены при выполнении научно-исследовательской работы в рамках выполнения государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России на осуществление прикладных научных исследований и разработок в период с 2018 по настоящее время:

- «Разработка перспективных направлений совершенствования экспертизы качества, эффективности и безопасности биологических лекарственных препаратов и стандартизация методов их оценки», регистрационный номер 121022000147-4 в ЕГИСУ НИОКТР по государственному заданию Минздрава России № ГЗ 056-00005-21-00 от 15.12.20200 на 2021 год и на плановый период 2022 и 2023 годов (№ 056-00005-21-01 от 27.10.2021, № 056-00005-21-02 от 18.11.2021.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, содержащих анализ современного состояния проблемы оценки содержания анти-D-Ат IgG в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D), описание материалов и методов

исследования, результаты собственных исследований, а также включает заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы. Работа изложена на 112 страницах машинописного текста, содержит 12 рисунков и 17 таблиц. Список цитированной литературы включает 102 источника, из которых 52 источника отечественных авторов, 50 - иностранных авторов.

Достоверность и апробация результатов

Все экспериментальные исследования проводились с использованием аттестованного и калиброванного оборудования в аккредитованной лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, прошедшего метрологическую поверку.

Достоверность результатов экспериментальных исследований основана на достаточном количестве экспериментальных данных, показаны точность и прецизионность результатов исследований. Экспериментальные данные обработаны и систематизированы с применением адекватных поставленным задачам методов описательной статистики.

Обоснованность и достоверность полученных данных подтверждается их апробацией посредством обсуждений на конференциях различного уровня.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на:

- Всероссийской научной конференции с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи», опубликованы тезисы: «Современное состояние проблемы оценки специфической активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$» авторов: Шведова Е.В., Кудашева Э.Ю., Мовсесянц А.А., Борисевич И.В., Олефир Ю.В. (Москва, 2019);
- Всероссийской научной конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы», опубликованы

тезисы: «Проблема специфической перинатальной профилактики резус-иммунизации женщин с резус-отрицательной принадлежностью крови» авторов: Шведова Е.В., Кудашева Э.Ю., Шведов Д.В., Климов В.И., Мовсесянц А.А. (Москва, 2021);

- Научно-практической конференции а рамках VIII Российского конгресса лабораторной медицины, опубликованы тезисы: «Совершенствование подхода к оценке содержания анти-D-антител в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D)» авторов: Шведова Е.В., Кудашева Э.Ю., Мовсесянц А.А. (Москва, 2022).

Основные результаты работы диссертационного исследования отражены в восьми научных работах, из них пять публикаций в изданиях, рецензируемых в базе SCOPUS и входящих в Перечень рецензируемых научных изданий высшей аттестационной комиссии.

Личный вклад автора

Автору принадлежит решающая роль в выборе направления исследования, получении экспериментальных данных, их интерпретации и обобщении полученных результатов. Во всех работах, выполненных в соавторстве, автору принадлежит ведущая роль в постановке задач, проведении экспериментальных исследований, анализе полученных результатов. Вклад автора в сборе, анализе и обобщении результатов является определяющим. Диссертация и автореферат написаны лично автором.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

НАУЧНЫЙ АНАЛИЗ СОВРЕМЕННОГО СОСТОЯНИЯ ПРОБЛЕМЫ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ АНТИ-D АНТИТЕЛ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА АНТИРЕЗУС $Rh_o(D)$

1.1 Номенклатура лекарственных препаратов иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$, разрешенных к применению в Российской Федерации

Среди иммунологически обусловленных осложнений беременности ведущее место занимает гемолитическая болезнь плода и новорожденного, развивающаяся вследствие несовместимости крови матери и плода по различным эритроцитарным антигенам [80, 62]. Среди антигенов эритроцитов системы резус наиболее иммуногенным является Аг D, способный даже в малых дозах вызывать образование иммунных Ат, которые являются причиной тяжелой гемолитической болезни плода и новорожденного [64, 33].

Несмотря на значительные достижения перинатальной медицины, проблема гемолитической болезни плода и новорожденного при резус-конфликтной беременности в нашей стране не может считаться до конца решенной [3]. В РФ ГБП диагностируется приблизительно у 0,9 – 1,0 % новорожденных, при этом частота развития резус-иммунизации за последние годы еще не получила существенной тенденции к снижению, при этом летальность составляет около 0,22 %. Заболеваемость новорожденных билирубиновой энцефалопатией находится в диапазоне от 0,4 до 2,7 на 100000 новорожденных [31, 43].

Снижение перинатальной заболеваемости и смертности от ГБП и новорожденных возможно только при организации мер по своевременной профилактике резус-изоиммунизации во время беременности и в раннем послеродовом периоде [24].

Единственными лекарственными средствами, используемыми для специфической перинатальной профилактики резус-иммунизации женщин с резус-отрицательной принадлежностью крови являются лекарственные препараты ИГЧ антирезус Rh_o(D). Успешный мировой опыт использования лекарственных препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D) для профилактики резус-иммунизации женщин насчитывает более 50 лет [86, 98, 1].

Они представляют собой концентраты антирезус Rh_o(D) Ат поликлонального IgG, полученные из плазмы крови здоровых доноров, иммунизированных D-антигеном эритроцитов человека [81, 82].

Лекарственные препараты ИГЧ антирезус Rh_o(D) производятся по методу Кона путем холодного этанолового фракционирования пула плазмы. Производственный процесс препаратов предусматривает этапы инактивации и удаления вирусов. Современная вирусная инактивация проводится химической обработкой фракции плазмы по методу растворитель/детергент разрешенными во всем мире при производстве продуктов из плазмы и рекомендованными регуляторными органами реагентами три-н-бутил фосфат и полисорбат-80 [18]. Обработка данными веществами является самым эффективным из известных на сегодняшний день методов инактивации вирусов в белковой оболочке, таких как вирус иммунодефицита человека, гепатита В и С. Удаление инактивированных как оболочных, так и безоболочных вирусов проводится на этапе этанольного осаждения, удаление остаточных веществ после стадий вирусной инактивации и химической обработки проводится с использованием аффинной хроматографии [2].

Фармакологическое действие лекарственных препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D) реализуется иммуносупрессией анти-D Ат резус-положительных

эритроцитов плода, попавших в кровоток матери. Из механизмов, предложенных в литературе для объяснения феномена антитело-опосредованной иммуносупрессии, три представляются наиболее правдоподобными:

1) механизм антигенного камуфляжа;

2) быстрое выведение антигена в комплексе с антителом;

3) избирательное подавление антиген-специфических В-клеток.

Однако, что за процесс (или совокупность процессов) лежит в основе иммунопрофилактики D-иммунизации, исследователями до настоящего времени не установлено [33].

Клинически подтверждено, что введение рассчитанных доз препаратов снижает вероятность развития резус-иммунизации женщин приблизительно в 100 раз [54]. Массовая профилактика после родов снизила частоту сенсибилизации женщин в 10 раз [60]. Последующие клинические испытания показали, что дополнительное введение лекарственных препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D) на 28-34 неделе беременности позволяет еще в 10 раз сократить число иммунизированных женщин [61].

В настоящее время номенклатура лекарственных препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D) Государственного реестра лекарственных средств Министерства здравоохранения РФ, а также разрешенных к применению в странах Европейского Союза, Соединенных штатах Америки и других государствах, представлена семью наименованиями препаратов. Основные характеристики лекарственных препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D) и ключевые особенности определения основного действующего вещества препаратов представлены в таблице 1 [11].

Таблица 1 – Номенклатура лекарственных препаратов иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$, зарегистрированных в Российской Федерации

Торговое наименование, производитель, Страна	Лекарственная форма, дозировка	Состав	Метод определения ОДВ	Стандартный образец, используемый для определения ОДВ	Эритроциты, используемые для определения ОДВ
1	2	3	4	5	6
ГиперРОУ С/Д, Грифолз Терапьютикс ЛЛС, США	Раствор для внутримышечного введения, 1500 МЕ/доза (0,5 мл)	ОДВ, глицин, водя для инъекций	Метод проточной цитофлуори-метрии	Стандартный образец фирмы калиброванный по отношению к МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ	D-положительные эритроциты фенотипа R1R1
Иммуноглобулин человека антирезус $Rh_o(D)$, ОБУЗ «Ивановская областная станция переливания крови», Россия	Раствор для внутримышечного введения, титр 1:1000,1:2000	ОДВ, глицин, вода для инъекций	Непрямая проба Кумбса	Нет	D-положительные эритроциты любого фенотипа
Иммуноро Кедрион, Кедрион С.п.А., Италия	Лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения, 300 мкг (1500 МЕ)/флакон	ОДВ, глицин, натрия хлорид	Метод проточной цитофлуори-метрии	Стандартный образец фирмы, калиброванный по отношению к МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ	D-положительные эритроциты фенотипа R1R1

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6
Торговое наименование, производитель, страна	Лекарственная форма, дозировка	Состав	Метод определения ОВД	Стандартный образец, используемый для определения ОВД	Эритроциты, используемые для определения ОВД
КамРОУ, Камада ЛТД, Израиль	Раствор для внутримышечного введения, 750 МЕ/мл	ОДВ, глицин, натрия хлорид	Метод автоматизированнойгемагглю-тинации	МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ	D-положительные эритроциты любого фенотипа
Партобулин СДФ,Бакстер АГ, Австрия	Раствор для внутримышечного введения, 1250 МЕ/мл	ОДВ, глицин, натрия хлорид	Метод автоматизированной гемагглю-тинации	МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ	D-положительные эритроциты любого фенотипа
Резогам Н, СиЭсЭл Беринг АГ, Швейцария	Раствор для внутривенного и внутримышечного введения, 750 МЕ/мл	ОДВ, глицин, натрия хлорид, альбумин человека	Метод проточной цитофлуори-метрии	МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ или стандартный образец фирмы, калиброванный по отношению к МСО	D-положительные эритроциты фенотипа R1R1
Резонатив, Октофарма, Швеция	Раствор для внутримышечного введения, 625 МЕ/мл	ОДВ, глицин, натрия хлорид	Метод иммуноферме-нтного анализа	МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ или стандартный образец анти-D иммуноглобулина ЕФ	D-положительные эритроциты фенотипа R2R2
Примечание: ОДВ – основное действующее вещество, МСО – международный стандартный образец, ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения, ЕФ – Европейская фармакопея					

Сравнительный анализ нормативных документов лекарственных препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D), представленных в таблице 1, позволил сделать вывод о том, что номенклатура препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D) представлена двумя лекарственными формами препаратов: раствор для внутримышечного или внутривенного введения и лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения.

Рекомендованными Европейским агентством по контролю лекарственных препаратов (European Medicines Agency (EMA)) показаниями к применению препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D) вне зависимости от пути введения являются:

1) профилактика резус-положительной иммунизации резус-отрицательных женщин, не сенсибилизированных к D-Аг:

- дородовая профилактика;

- дородовая профилактика осложнений беременности: аборт или угрожающий аборт, внематочная беременность или пузырный занос; внутриутробная смерть плода, трансплацентарная трансфузия в результате дородового кровотечения, амниоцентеза, биопсии хориона, акушерских манипуляций, например, наружного акушерского поворота, инвазивного вмешательства, кордоцентеза, травмы брюшной полости или терапевтического внутриутробного вмешательства;

- послеродовая профилактика;

2) лечение резус-отрицательных пациентов после переливания несовместимой резус-положительной крови или других препаратов, содержащих эритроциты [73].

Лекарственные препараты ИГЧ антирезус Rh_o(D) для внутримышечного введения помимо основного действующего вещества (не менее 90% иммуноглобулинов G) содержат вспомогательные вещества в качестве стабилизаторов – глицин и натрия хлорид, в состав препарата для внутривенного введения дополнительно включен альбумин человека.

В современных зарубежных лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) содержание анти-D Ат, способных нейтрализовать резус-положительные эритроциты плода, попавших в кровоток матери, выражают количественно в МЕ или в мкг по отношению к МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ.

Для обеспечения правильности и удобства расчета профилактических доз введения содержание анти-D Ат в зарубежных лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) может быть 125 мкг (625 МЕ), 150 мкг (750 МЕ), 250 мкг (1250 МЕ), 300 мкг (1500 МЕ), поскольку профилактическую дозу лекарственных препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D) рассчитывают после подсчета количества эритроцитов плода, попавших в кровоток матери, с использованием лабораторных методов анализа, например, модифицированным методом кислотного вымывания-окрашивания по Кляйхауэру и Бетке [27, 26]. Установлено, что 10 мкг (50 МЕ) анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) нейтрализует 0,5 мл резус-положительных эритроцитов плода (или 1 мл цельной крови). Неадекватная доза введения может привести к анафилактическим реакциям, гемолизу или не сможет обеспечить предотвращение изоиммунизации [78, 63].

Оценка содержания основного действующего вещества в зарубежных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) проводится методами автоматизированной гемаглютинации, иммуноферментным и проточной цитофлуориметрии в сравнении с МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ или стандартными образцами, приведенными в соответствие к МСО, с применением D-положительных эритроцитов определенного фенотипа: R1R1 или R2R2.

В нашей же стране указанные методы не внедрены на отечественных производствах иммунобиологических лекарственных препаратов и не представлены в структуре ГФ РФ, национальные стандартные образцы отсутствуют.

Оценка специфической активности отечественного лекарственного препарата ИГЧ антирезус Rh_o(D) проводится непрямой пробой Кумбса в титрах визуально без использования стандартного образца, что затрудняет адекватно

оценить содержание анти-D Ат в 1 мл препарата для расчета дозы введения и может стать причиной отсутствия требуемого терапевтического эффекта, а также развития нежелательных реакций [49].

В результате проведенного анализа нормативной документации производителей лекарственных препаратов ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$, зарегистрированных в РФ, а также нормативно-правой базы РФ, требований и рекомендаций ведущих международных регуляторных органов в сфере обращения лекарственных средств было установлено, что основным показателем качества лекарственных препаратов ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$, играющим ключевую роль в обеспечении их терапевтической эффективности и безопасности, является специфическая активность основного действующего вещества - количество анти-D Ат, способных к нейтрализации D-положительных эритроцитов крови, попавших в кровоток матери с резус-отрицательной принадлежностью крови.

Таким образом, оценка специфической активности лекарственных препаратов ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ должна быть количественной и точной, что может быть обеспечено только применением валидированных, специфичных, селективных и доступных инструментальных биоаналитических методик с использованием МСО ВОЗ или стандартных образцов, приведенных в соответствие к нему.

1.2 Современные подходы к оценке содержания анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$

В первых разработанных лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ содержание анти-D Ат оценивали в титрах в реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации (непрямой пробой Кумбса), что не позволяло количественно оценить содержание анти-D Ат, способных нейтрализовать резус-положительные эритроциты плода. В результате разработки МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ

и внедрения современных иммунохимических методов стало возможным проводить оценку специфической активности препаратов количественно в МЕ или в микрограммах.

В настоящее время в мире для определения специфической активности лекарственных препаратов ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ применяются различные иммунологические методы гемагглютинации (непрямая проба Кумбса, автоматизированная гемагглютинация и гемагглютинация в геле) и иммунохимические методы проточной цитофлуориметрии и иммуноферментный.

Непрямая проба Кумбса

Структурно анти-D Ат являются неполными, что в отличие от полных Ат (полимерных молекул иммуноглобулина изотипа М, некоторых А и G) частично препятствует их визуализации в традиционной для иммуноглобулинов реакции преципитации [48, 36]. Причинами этого явления может быть экранирование одного из антигенсвязывающих центров молекулы IgG, а также недостаточное число или малая доступность антигенных детерминант в структуре белка [71]. Поэтому в начале 60-х годов XX века для оценки содержания анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ был предложен метод непрямой (пассивной) гемагглютинации - непрямая проба Кумбса, основанный на реакции агглютинации резус-положительных эритроцитов, обработанных папаином, и антиглобулиновой сыворотки с анти-D Ат в препарате. Для воспроизведения метода используют D-положительные эритроциты I(0) группы крови человека любого фенотипа [75].

Результаты, получаемые с помощью непрямой пробы Кумбса, оценивают визуально по наличию агглютинации в гемолизате, образованном при добавлении эритроцитов и антиглобулиновой сыворотки в каждое последовательное разведение испытуемого и стандартного образцов. Последнее разведение, в котором наблюдается агглютинация, принимают за титр анти-D Ат. Если

агглютинация эритроцитов наблюдается во всех разведениях исследуемого образца, то титр Ат выше, чем полученные разведения. В этих случаях повторяют титрование, приготовив еще большие разведения исследуемого препарата ИГЧ антирезус Rh_o(D).

Субъективная интерпретация результатов при визуальном полуколичественном определении в титрах не позволяет в полной мере охарактеризовать специфическую активность лекарственного препарата ИГЧ антирезус Rh_o(D). Антиглобулиновая сыворотка (реагент Кумбса), используемая в методе, содержит множество компонентов, среди которых антикомплементарные Ат, в частности к C3d-, C3c-, C4c- и C4d- компонентам комплемента, которые адсорбируются на поверхности эритроцитов и создают видимость положительного результата. Также возможно получение результата отсутствия агглютинации, связанное с низкой аффинностью Ат сыворотки, сенсибилизирующих эритроциты [17].

В дальнейшем, с целью минимизации субъективности оценки результатов, получаемых при использовании непрямой пробы Кумбса, было предложено применение автоматизированных систем оценки результатов. В настоящее время одним из современных методов, применяемым в зарубежных контрольно-аналитических лабораториях для оценки качества лекарственных препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D), является метод автоматизированной гемагглютинации.

Метод автоматизированной гемагглютинации

При использовании прибора для автоматического анализа регистрируют оптическую плотность гемолизата, полученного в результате реакции гемагглютинации. По результатам измерений разведений стандартного образца строят калибровочный график зависимости значений оптической плотности от содержания анти-D Ат и в линейном диапазоне определяют специфическую активность испытуемого образца.

Однако инструментальный метод автоматизированной гемагглютинации имеет ряд недостатков: низкая селективность метода не позволяет дифференцированно определять Ат класса IgG от Ат класса IgM, которые не оказывают влияния на прогноз гемолитической болезни плода и новорожденного. Отсутствие стандартизации фенотипов эритроцитов, используемых в методе в качестве реагента, не обеспечивает достоверность получаемых результатов, поскольку антигены мембраны эритроцитов различных фенотипов могут оказывать влияние на связывание с анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D), кроме того, инструментальный метод автоматизированной гемагглютинации требует наличия в лаборатории дорогостоящего оборудования [53].

Успехи в развитии иммунологических методов исследований, молекулярно-генетических технологий, в частности создание моноклональных Ат, позволили разработать новые более селективные и специфичные методы, такие как методы гемагглютинации в геле, проточной цитофлуориметрии и иммуноферментный.

Метод гемагглютинации в геле

Метод гемагглютинации в геле, предложенный Y.Lapierre в 1989 году, является более стандартизированным в сравнении с непрямой пробой Кумбса за счет применения гелевых карт и более специфичным в сравнении с методом автоматизированной гемагглютинации за счет использования моноклональных Ат, которые обеспечивают большую прецизионность и достоверность результатов определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) [5].

Гелевые карты, представляют собой пластиковый планшет с микропробирками. Каждая микропробирка состоит из дозирующей/инкубационной камеры и колонки, наполненной раствором геля. Раствор геля содержит смесь поликлонального античеловеческого глобулина (анти-IgG) и моноклональных анти-C3d-Ат. Агглютинированные резус-

положительные эритроциты человека в результате взаимодействия с анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ при прохождении через колонку карты удерживаются в верхней или средней части колонки, не агглютинированные эритроциты скапливаются в нижней части микропробирки, образуя осадок. Последнее разведение испытуемого образца, при котором наблюдают агглютинацию, принимают за титр анти-D Ат. Оценку результатов проводят в сравнении со стандартным образцом [20].

Метод проточной цитофлуориметрии

С середины 90-х годов XX века для количественного определения анти-D-АтIgG в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ применяется высокочувствительный инструментальный метод с использованием проточного цитофлуориметра. Метод основан на измерении интенсивности флуоресценции комплекса, образованного последовательным специфическим связыванием D-положительных эритроцитов с анти-D Ат и флуоресцентно-меченными Ат (конъюгат), при этом могут использоваться два антигенсвязывающих фрагмента конъюгата – Fab- и Fc- участки молекулы белка или цельная молекула [85].

Значения активности получают в МЕ (или мкг) с применением стандартного образца при построении графика зависимости логарифма концентрации и интенсивности флуоресценции по данным, полученным из серии стандартных растворов. Для воспроизведения метода используют положительные эритроциты I(0) группы крови человека фенотипа R1R1, собранных не менее чем от 3 доноров [56].

К недостаткам метода следует отнести возможное влияние различных антигенов эритроцитов (антигены системы резус C, C^W, а также антигены системы Kell), которые могут создавать эффект интерференции, что может влиять на правильность получаемых результатов. Кроме того, необходимость оценки прецезионности применяемых в методе специфических моноклональных

антительных конъюгатов, таких как анти-Fc, анти-F(ab')2, анти-цельный IgG, увеличивает трудозатраты, а использование специального дорогостоящего оборудования и реагентов не всегда доступно для некоторых лабораторий, также предъявляются высокие требования к квалификации персонала [45, 88, 89].

Метод иммуноферментного анализа

Иммуноферментный прямой конкурентный метод для количественной оценки содержания анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) был предложен S.J. Thorpe и коллегами в 2000 году. Метод основан на конкуренции меченных биотинилированных моноклональных анти-D Ат к специфическому эпитопу D с немеченными (исследуемыми) Ат препарата за связывание с D-Аг эритроцитов, адсорбированными на твердой фазе. Количество меченных Ат, присоединившихся к эритроцитам, снижается пропорционально содержанию в смеси исследуемых Ат [92].

В качестве рабочих моноклональных Ат используются Ат BioBRAD-5 - человеческие моноклональные Ат IgG1, полученые из стабильных В-лимфобластоидных клеток, трансформированных вирусом Эпштейна-Барр. Были выбраны из-за их доказанной in vitro активности в стимулировании лизиса эритроцитов в антителозависимых клеточно-опосредованных анализах цитотоксичности.

Связывание с конъюгатом для последующего выявления присоединившихся Ат достигается за счет использования системы «биотин - авидин-стрептавидин». Молекулы кофермента биотина, конъюгируют с моноклональными анти-D Ат при помощи биотинил-N-гидроксисукцимида. Затем биотин связывается с белковым комплексом авидин-стрептавидин, конъюгированным щелочной фосфатазой. Аффинность связи между авидином и биотином высокая, константа диссоциации лиганда 10^{-15} моль, что обеспечивает высокую стабильность образовавшегося комплекса [65]. Стрептавидин используется для исключения неспецифической

сорбции авидина на других молекулах. Конъюгат авидин-стрептавидин прочно фиксируется на комплексе, образованном биотинилированными моноклональными анти-D-Ат и антигенами эритроцитов. После добавления субстрата (паранитрофенилфосфата) проводят определение продуктов реакции с использованием спектрофотометра.

В соответствии с требованиями Европейской Фармакопеи для воспроизведения метода используют D-положительные эритроциты I(0) группы крови человека определенного фенотипа - R2R2, собранные не менее чем от 3 доноров. Значения активности определяют в МЕ определяют при построении графика зависимости концентрации и оптической плотности по данным, полученным из серии растворов стандартного образца. Высокая специфичность метода достигается за счет использования меченных биотином Ат, поскольку конкуренция между ними и исследуемый образцом происходит только за специфический эпитоп D-Аг эритроцитов, что исключает неспецифическое связывание [94].

Все современные методы с помощью которых проводят количественное определение анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ сопряжены с использованием эритроцитов человека, что предполагает обязательное использование стандартного образца [77].

Стандартные образцы, применяемые для оценки содержания анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$

Известно, что необходимым условием, позволяющим выполнять задачи метрологического обеспечения методик оценки качества иммунобиологических лекарственных препаратов, в том числе препаратов ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$, и оценивать сопоставимость полученных результатов, обеспечивая необходимую

точность и прослеживаемость измерений, является использование стандартных образцов [29, 42].

По требованиям, изложенным в Фармакопее Соединенных Штатов Америки, оценка качества лекарственных препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D) по показателю «Специфическая активность анти-D иммуноглобулина» должна проводиться в сравнении с МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ любым валидированным методом [70].

В Европейской Фармакопее подход к оценке активности анти-D иммуноглобулина представлен тремя инструментальными методами: автоматизированной гемагглютинации, проточной цитофлуориметрии и иммуноферментным, при этом в качестве стандартного образца необходимо использовать стандартный референтный образец (BRP) Европейского директората по качеству лекарственных средств (EDQM) анти-D иммуноглобулина, который является стандартным образцом Европейской фармакопеи и аттестован относительно МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ, или применять непосредственно МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ [76].

Опыт применения МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ для определения анти-D Ат в лекарственных препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D) насчитывает более 40 лет. В 1968 году в результате анализа данных, полученных при использовании метода гемагглютинации (непрямой пробой Кумбса) для разработки первого МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ, было установлено, что титры антирезус Rh_o(D) варьировали в широком диапазоне (до 500 раз) [91]. Поэтому в 1978 году экспертная комиссия ВОЗ по стандартизации биологических препаратов инициировала глобальные исследования по разработке и аттестации МСО анти-D иммуноглобулина с участием 17 лабораторий в 21 стране [4]. Для определения содержания анти-D Ат в МСО использовали метод изотопной маркировки, который позволил определить количественное содержание анти-D-Ат IgG в микрограммах. В последствии образцу были присвоены международные единицы дозы вещества – МЕ (эквиваленты биологической активности). Было установлено,

что метод непрямой гемагглютинации в сравнении с МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ при параллельных постановках, наиболее воспроизводим [58].

Первый МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ № 68/419 с аттестованной характеристикой содержания анти-D Ат 300 МЕ/мл (или 60 мкг) использовался только для метода гемагглютинации [87].

В 2002 году был разработан и аттестован второй МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ № 01/572 с содержанием анти-D Ат 285 МЕ/мл. Его использование предполагалось уже для трех методов: гемагглютинации, проточной цитофлуориметрии и иммуноферментного [99].

В 2018 году был аттестован третий МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ № 16/322 с содержанием анти-D Ат 297 МЕ/мл. Его использование также предусмотрено для количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) тремя методами [100].

Однако ВОЗ настоятельно рекомендует использование национальных (отечественных) стандартных образцов [21]. В РФ в соответствии с Федеральным законом ФЗ-61 «Об обращении лекарственных средств» в качестве национальных стандартных образцов предусмотрено использование ФСО [47, 32].

С экономической точки зрения для производства и оценки качества при подтверждении соответствия требованиям нормативной документации использование национальных ФСО более целесообразно. Кроме того, указанные стандартные образцы могут применяться и для аттестации стандартных образцов предприятия [28, 7].

В РФ исследования по разработке и аттестации национального ФСО для количественного определения анти-D-Ат IgG в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) не проводились.

1.3 Выбор направления совершенствования оценки содержания анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$

Сравнительный анализ современных методов количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ позволил сделать вывод о том, что методы проточной цитофлуориметрии и иммуноферментный за счет использования моноклональных Ат и стандартизации фенотипов эритроцитов, используемых в методах в качестве реагента, обладают большей специфичностью и селективностью в сравнении с методами гемагглютинации.

Однако метод проточной цитофлуориметрии не оправдывает себя, прежде всего высокой стоимостью импортного оборудования и его обслуживания, расходных материалов, сложностью методик, требующих оценки прецизионности моноклональных конъюгатов, что не всегда доступно для контрольно-аналитических лабораторий на производственных площадках.

Высокая специфичность за счет использования стандартизованных моноклональных Ат, производительность за счет использования многолуночных полистироловых планшетов, отсутствие зависимости от дорогостоящего импортного оборудования делают иммуноферментный метод наиболее приемлемым в сравнении с методами автоматизированной гемагглютинации и проточной цитофлуориметрии для внедрения в практику отечественного здравоохранения с целью контроля качества лекарственных препаратов ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$.

Применение количественного иммуноферментного метода для аттестации национального ФСО для определения активности иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$ в МЕ (или мкг), предназначенного в том числе и для метода гемагглютинации позволит производителям отечественных лекарственных препаратов ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ установить значения содержания анти-D Ат в МЕ (или мкг), что будет способствовать адекватному расчету дозы введения

препарата в соответствии с клиническими рекомендациями Минздрава РФ и международными требованиями к их клиническому применению [50].

Особенностью воспроизведения иммуноферментного метода для количественной оценки содержания анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) является самостоятельное приготовление иммуносорбента. Известно, что Аг, используемые для приготовления иммуносорбента, во многом предопределяют чувствительность и специфичность методики ИФА. Иммобилизация Аг на твердой фазе при приготовлении иммуносорбента является первым этапом, от которого зависят точность и прецизионность получаемых результатов количественного определения анти-D Ат в испытуемых препаратах [19].

Приготовление иммуносорбента для количественной оценки содержания анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) методикой ИФА не стандартизовано и проводится в условиях лаборатории без использования автоматизированных систем [79].

В соответствии с монографией Европейской Фармакопеи в качестве Аг для приготовления иммуносорбента при количественном определении анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) рекомендовано использовать D-положительные эритроциты I(0) группы крови человека только фенотипа R2R2, полученные не менее чем от 3-х доноров [55].

В последние годы в зарубежных лабораториях для аттестации 3-го МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ № 16/332 были предприняты попытки использования и D-положительных эритроцитов фенотипа R1R1, как наиболее часто встречаемых в популяции [77]. В частности, частота распространенности гаплотипа эритроцитов фенотипа R1R1 в российской популяции - 40,76%, в то время как фенотип эритроцитов R2R2 распространен значительно реже, частота распространенности гаплотипа - 14,11 % [14].

Принадлежность эритроцитов к фенотипам определена различиями в комбинациях их наиболее значимых антигенов (D, C, c, E, e) клеточной мембраны, несущими серологическую активность. Выраженность антигенов на эритроцитах вырьирует в широком диапазоне, что обусловлено генетическими факторами [16].

Эритроциты отличаются степенью агглютинации при взаимодействии с Ат в зависимости от комбинации антигенов. При взаимодействии анти-D Ат с эритроцитами фенотипа R2R2 агглютинация выражена сильнее, чем эритроцитов фенотипа R1R1, поскольку количество антигенных участков на эритроцитах в наборе которых содержатся антигены D и E больше, чем на эритроцитах с Аг D и C. Это связано с наличием полипептидов C и e, переплетающихся в оболочке эритроцита фенотипа R1R1 с полипептидом D, которые затрудняют доступ анти-D Ат к участкам D-Аг, в результате чего создается видимость слабого реагирования D-положительных эритроцитов с анти-D Ат, при этом и на тех и на других эритроцитах может присутствовать одинаковое количество антигенных детерминант [13].

Таким образом, для количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) методикой ИФА выбор фенотипа эритроцитов человека должен быть экспериментально обоснован, поскольку различия в наборе их Аг могут оказывать влияние на сорбционную способность клеток при их иммобилизации на твердой фазе, воспроизводимость методики и достоверность получаемых результатов.

В тоже время экспериментальные исследования по изучению особенностей распределения эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 на твердой фазе, а также их способности к образованию иммунных комплексов с анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) при количественном определении методикой ИФА ранее не проводились [93, 23].

Другими существенными недостатками методики ИФА являются:

- на этапе приготовления иммуносорбента отсутствует визуальная и инструментальная оценка распределения эритроцитов фенотипа R2R2 на твердой фазе, что снижает воспроизводимость методики и может приводить к получению недостоверных результатов анализа;

- высокая трудоемкость способа, связанная с увеличением времени постановки ИФА и расхода реагентов для проведения последующих этапов метода при отсутствии визуальной и количественной инструментальной оценки распределения эритроцитов в приготовленном иммуносорбенте;

- отсутствуют критерии приемлемости оценки получаемых результатов, соответствие которым гарантирует правильность количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) методикой ИФА;

- отсутствует национальный ФСО для определения специфической активности (содержания анти-D-Ат) лекарственных препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D), обеспечивающий стандартизацию количественного определения анти-D-Ат, в том числе методикой ИФА.

Таким образом, проведенный анализ современного состояния проблемы оценки содержания анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) выявил необходимость усовершенствования методики ИФА, заключающееся:

- во внедрении возможности использования эритроцитов наиболее распространенного фенотипа R1R1 для приготовления иммуносорбента в лабораторных условиях в дополнение к фенотипу R2R2;

- в разработке критериев иммобилизации эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 на твердой фазе для оценки корректности этапа приготовления иммуносорбента;

- в разработке критериев приемлемости оценки получаемых результатов количественного определения анти-D Ат методикой ИФА;

- в стандартизации усовершенствованной методики ИФА путем разработки ФСО ГФ РФ для определения активности ИГЧ антирезус Rh_o(D) (содержания анти-D-Ат).

Такой подход позволит гарантировать достоверность, точность и надежность результатов количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D), что обеспечит прогнозирование безопасности и эффективности их клинического применения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

В настоящем исследовании использовали следующие материалы.

Стандартные образцы:

- 3-й Международный стандартный образец анти-D иммуноглобулина ВОЗ с аттестованным значением активности 297 МЕ/мл (3-th WHO International Standard for anti-D immunoglobulin, NIBSC, code: 16/332);

- Стандартный образец иммуноглобулина человека нормального, не содержащий анти-D Ат (Anti-D antibodies test negative control, BRP, EDQM code: Y0000540);

- Стандартный образец иммуноглобулина человека нормального с содержанием анти-D-Ат, определяемых в реакции агглютинации в разведении 1:8 (Immunoglobulin (anti-D anti dodies test) BRP batch 1:8, EDQM, code:Y0000540) [67];

Лекарственные препараты ИГЧ антирезус Rh_o(D):

- «ИммуноРоКедрион», лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения, 300 мкг (1500 МЕ) (флаконы) в комплекте с растворителем: вода для инъекций (ампулы) производства Кедрион С.п.А., Италия (препарат № 1);

- «Резогам», раствор для внутривенного и внутримышечного введения, 1500 МЕ (300 мкг)/2 мл (шприцы) производства СиЭсЭл Беринг, Швейцария (препарат № 2);

- «Иммуноглобулин человека антирезус $Rh_o(D)$», раствор для внутримышечного введения доза 1 мл (ампула), титр антител 1:1000, 1:2000 производства ОБУЗ «Ивановская областная станция переливания крови», Россия;

- кандидат в ФСО биологического происхождения ГФ РФ «Стандартный образец для определения активности иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$ (содержание анти-D-антител IgG)» - Иммуноглобулин человека антирезус $Rh_o(D)$, раствор для внутримышечного введения доза 1 мл (ампула), титр антител 1:1000, 1:2000, серии 011221 производства «Областное бюджетное учреждение здравоохранения «Ивановская областная станция переливания крови», Россия, дата выпуска: 27.01.2021, срок годности до 01.01.2024;

Международные межлабораторные исследования проводили с использованием контрольных испытуемых образцов №№ 1,2,3,4 с неизвестным содержанием определяемого вещества, предоставленные Европейским директоратом по качеству лекарственных средств (EDQM) Совета Европы, зарегистрированного по адресу: аллея Кастнер 7, 67081, Страсбург, Франция, организатором сравнительного исследования по подтверждению квалификации количественного определения анти-D-Ат IgG в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ («Proficiency Testing Scheme (PTS) 223: Human anti-D immunoglobulin assay»).

Для методики ИФА использовали следующие материалы:

- консервированные D-положительные эритроциты фенотипов R1R1 и R2R2 и D-отрицательные эритроциты фенотипа rr I(0) группы крови человека, отобранные не менее чем от трех доноров (Эритроциты ID-DiaCell I-II-III 5 % производства Российский Научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии, г. Санкт-Петербург, кат. № СтЭр-4);

- свежеприготовленные на станции переливания крови D-положительные эритроциты фенотипов R1R1 и R2R2 и D-отрицательные эритроциты фенотипа rr

I(0) группы крови человека, отобранные не менее чем от трех доноров (эритроциты производства ОБУЗ «Брянская станция переливания крови», Россия);

- рабочие биотилированные моноклональные анти-D-Ат (Working Standard Biotinylated BRAD-5, NIBSC, code: 02/230) [102];

- реагенты: папаин (Sigma Aldrich, кат. № P4762), глютаральдегид (Sigma Aldrich, кат. № G5882), глюкоза (Sigma Aldrich, кат. № G7528), натрия цитрат (Sigma Aldrich, кат. № S4641), L-цистеин (Sigma Aldrich, кат. № 168149), динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (натрия ЭДТА) (Sigma Aldrich, кат. № E4884), кислота борная (Merck, кат. № 1.00165), бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma Aldrich, кат. № A7030), 1М раствор хлористоводородной кислоты (Merck, кат. № 1.09871), авидин-стрептовидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой (Sigma Aldrich, кат. № E 2636), субстрат паранитрофенил фосфат (Sigma Aldrich, кат. №7653), натрия гидроксид (Merck, кат. № 106469), трис(гидроксиметил)аминометан (SigmaAldrich, кат. № 3362), натрия хлорид (Sigma Aldrich, кат. № 13423), калия хлорид (Sigma Aldrich, кат. № 746436), натрия хлорид (Sigma Aldrich, кат. № 13423), калия дигидрофосфат (Sigma Aldrich, кат. № P0662), безводный натрия гидрофосфат (Sigma Aldrich, кат. № 53560).

В качестве твердой фазы опытным путем были выбраны полистироловые прозрачные 96-луночные микропланшеты с максимальной сорбционной емкостью (650 нг белка/см^2) (MaxiSorp, Nunc, кат. № 44-2404-21).

Для метода гемагглютинации в геле использовали:

- гелевые карты для проведения непрямой реакции Кумбса (Diagnostic Grifols S.A., кат. № 210342, Испания);

- стандартные 0,8% папаинизированные эритроциты человека I(0) группы крови (Diagnostic GrifolsS.A., кат. № Испания);

- физиологический раствор – 0,9 % натрия хлорид (ООО НП «ПанЭко», кат. № Р010п, Россия).

Для изучения иммобилизации эритроцитов при приготовлении иммунсорбента использовали микроскоп AxioScopeA1 (CarlZeiss, Германия) с цифровой фотокамерой и прикладным компьютерным обеспечением для регистрации изображений.

Количественные морфометрические измерения цифровых фотоснимков лунок планшета для количественной оценки распределения эритроцитов при приготовлении иммуносорбента получали с использованием лицензионной аналитической программы Image-ProPremier Media Cybernetics (Media Cybernetics, США), предназначенной для морфометрического анализа изображений с визуализацией [38].

ИФА проводили с использованием следующего оборудования:

- мешалка магнитная IKARH basic 2 (IKA, Германия);

- центрифуга многофункциональная 5810R (Eppendorf AG, Германия);

- весы прецизионные Adventurer AR-5120 (Ohaus, США);

- термостат BD 115 (Binder, Германия);

- термометр технический стеклянный ТТМ, диапазон измерений от 0 до 100 °С (ОАО «Термоприбор», Россия).

- pH-метр S220 Seven Compact (Mettler Toledo AG, Китай);

- установка для очистки воды Milli-QIQ 7003 (Millipore SAS, Франция);

- термошейкер для иммунологических планшетов ST-3 (Elmi, Россия);

- спектрофотометр MultiskanGo (ThermoScientific, США).

Для проведения исследований методом гелевой гемагглютинации использовали центрифугу Dianafuge (DiagnosticGrifolsS.A., Испания).

Все экспериментальные исследования проводились в аккредитованной лаборатории Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России с

использованием аттестованного и калиброванного оборудования, что подтверждается метрологическими заключениями.

2.2 Методы исследования

Определение содержания анти-D Ат в испытуемых образцах проводили методами иммуноферментным конкурентным прямым и гемагглютинации в геле.

Изучение параметров иммобилизации эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 на поверхности твердой фазы при приготовлении иммуносорбента проводили цифровой оптической микроскопией в соответствии с ГФ РФ ОФС.1.2.1.0009.15 «Оптическая микроскопия» при увеличении в 10^2 раз [34].

Количественную оценку распределения эритроцитов проводили компьютерной морфометрией с визуализацией путем автоматической оценки абсолютной и относительной площади соответствующего цветового спектра по отношению к заданной при настройках пространственной калибровки общей площади лунки планшета.

Для методики ИФА определяли коэффициент детерминации (R^2) линейной регрессии при построении калибровочного графика зависимости оптической плотности (относительные единицы (ОЕ)) от концентрации растворов МСО (логарифм значений содержания анти-D Ат).

Содержание анти-D Ат (МЕ/мл) в испытуемых образцах определяли по формулам (1,2,3):

$$C_i = A + B\,ln\,[C_{ст}], \quad (1),$$

$$C_i = K \times exp\left(\frac{[ОП_u - A]}{B}\right), \quad (2),$$

$$C_{изм} = \frac{\sum_{i-1}^{n} Ci}{n}, \quad (3),$$

где:

C_i – содержание анти-D Ат, при одном определении, МЕ/мл;

exp – функция для пересчета логарифма при построении линейного графика;

A, B – коэффициенты уравнения линейной регрессии калибровочного графика;

$C_{ст}$ – содержание анти-D Ат в растворе МСО, МЕ/мл;

$ОП_и$– оптическая плотность испытуемого образца, ОЕ;

К – коэффициент разведения;

$C_{изм}$– среднее значение содержания анти-D Ат, рассчитанное по трем определениям, МЕ/мл;

n – количество определений.

Для оценки правильности рассчитывали величину степени извлечения (*r*, %) по формуле (4):

$$r = \frac{C_{изм}}{C_{теор}} \times 100\%, \quad (4),$$

где:

$C_{изм.}$ – среднее значение содержания анти-D Ат в испытуемом образце, рассчитанное по 3 определениям, МЕ/мл;

$C_{теор.}$ – за теоретическое значение принимали количество анти-D Ат в МСО, добавленных в раствор стандартного образца иммуноглобулина человека нормального, не содержащего анти-D-Ат IgG.

Для расчета содержания анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) использовали лицензионные программы статистической обработки результатов ИФА методом параллельных линий "Паралайн" и "PLA Database version 2.0.0" (build 551), S/N: 10536 [40,84].

Данные обрабатывали с использованием пакета программ IBM SPSS Statistics версии 20 (Microsoft Windows, США). Применяли параметрические и непараметрические методы описательной статистики.

Расчет статистических параметров выполняли с помощью формул и табличных данных. Рассчитывали среднее арифметическое значение, стандартное

отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD, %). Доверительный интервал рассчитывали как произведение SD и количества значений в группе данных при p=0,05. Определение соответствия значений выборки нормальному распределению проводили с применением критерия Шапиро-Уилка и коэффициента аппроксимации линейной зависимости при сортировке значений выборки. Значимость различий данных оценивали с помощью t-критерия Стьюдента, для независимых выборок значимость различий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни [8, 90].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИ-D АНТИТЕЛ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА АНТИРЕЗУС Rh_o(D)

3.1 Оценка возможности использования D-положительных эритроцитов I(0) группы крови человека фенотипа R1R1 для приготовления иммуносорбента

Для оценки возможности использования D-положительных эритроцитов I(0) группы крови человека фенотипа R1R1 в дополнение к фенотипу R2R2 для приготовления иммуносорбента при количественном определении анти-D Ат в испытуемых образцах предварительно готовили следующие растворы.

Фосфатно-солевой буферный раствор (ФБР) pH 7,4. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещали 8 г натрия хлорида, 0,76 г натрия гидрофосфата безводного, 0,2 г калия хлорида, 0,2 г калия дигидрофосфата, 0,2 г натрия азида, добавляли 900 мл воды очищенной и перемешивали. Доводили pH до 7,4 с помощью 0,1М раствора хлористоводородной кислоты. Общий объем раствора доводили до метки водой очищенной и перемешивали. Срок хранения раствора 1 месяц при температуре 2–8 ºС.

ФБР pH 5,4. ФБР pH 7,4 доводят до pH 5,4 с помощью 0,1М раствора хлористоводородной кислоты, добавляли воды очищенной и перемешивали. Срок хранения раствора 1 месяц при температуре 2–8 ºС.

10% раствор папаина. В пробирку вместимостью 10 мл помещали 1 г папаина, прибавляли 5 мл ФБР pH 5,4 и перемешивали. Затем в пробирку помещали 0,05 г L-цистеина и 0,04 г динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА натрия), общий объем доводили до

метки ФБР pH 5,4 и перемешивали. Срок хранения раствора 1 сутки при температуре 2–8 ºС.

ФБР для фиксации клеток. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещали 18 г глюкозы, 10 г натрия цитрата, 0,7 г натрия ЭДТА, добавляли 900 мл ФБР pH 7,4 и перемешивали. Доводили pH до 7,0 с помощью 0,1М раствора хлористоводородной кислоты. Общий объем доводили до метки ФБР pH 7,4 и перемешивали. Срок хранения раствора 1 месяц при температуре 2–8 ºС.

0,05% раствор глютеральдегида. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 500 мкл глютеральдегида, растворяли в 50 мл воды очищенной, общий объем доводили до метки и перемешивали. Раствор использовали свежеприготовленным.

2% раствор БСА. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 2 г БСА, растворяли в ФБР с pH 7,4, доводили общий объем до метки и перемешивали. Срок хранения раствора 1 неделя при температуре 2–8 ºС.

1% раствор БСА. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 1 г БСА, растворяли в воде очищенной, доводили общий объем до метки и перемешивали. Срок хранения раствора 1 неделя при температуре 2–8 ºС.

Раствор биотинилированных моноклональных анти-D Ат (BioBRAD-5 NIBSC) с концентрацией 0,25 мг/мл. Содержимое флакона восстанавливали в воде очищенной. К 1 мл восстановленного раствора добавляли 39 мл 1% раствора БСА и перемешивали. Раствор использовали свежеприготовленным.

Трис-буферный раствор с содержанием 1% БСА. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 8 г натрия хлорида, 0,6 г трис(гидроксиметил)аминометана, растворяли в 80 мл воды очищенной, доводили pH до 7,0 с помощью 0,1М раствора хлористоводородной кислоты. Затем добавляли 1 г БСА, растворяли, доводили общий объем до метки водой очищенной и перемешивали. Срок хранения раствора 1 неделя при температуре 2–8 ºС.

Раствор авидин-стрептовидина, конъюгированного с щелочной фосфатазой. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 50 мкл авидин-стрептовидина,

конъюгированного с щелочной фосфатазой и доводили общий объем до метки трис-буферным раствором с содержанием 1% БСА. Раствор использовали свежеприготовленным.

Раствор субстрата паранитрофенил фосфата. Готовили в соответствии с инструкцией по применению.

3 М раствор натрия гидроксида. В мерную колбу вместимостью 1 л помещали 120 г (точная навеска) натрия гидроксида (ч.д.а.) и растворяли в 1 л воды очищенной. Срок хранения раствора 6 месяцев при комнатной температуре.

Приготовление растворов стандартного образца. Лиофилизат МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ восстанавливали в 1 мл воды очищенной в соответствии с инструкцией по применению. Растворы МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ с содержанием анти-D-Ат IgG (30; 15; 7,5; 3,75; 1,88 МЕ/мл) готовили последовательным двукратным разведением с использованием трис-буферного раствора с содержанием 1% БСА.

Готовили модельные смеси (с известным содержанием анти-D Ат) с использованием МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ. Модельные смеси готовили методом добавок следующим образом: предварительно готовили раствор стандартного образца иммуноглобулина человека нормального, не содержащего анти-D Ат (BRP) согласно инструкции, затем к полученному раствору в отношении 1:1 добавляли раствор МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ с активностью 297 МЕ/мл, получая раствор стандартного образца с содержанием анти-D-Ат IgG 148,5 МЕ/мл. Далее готовили испытуемые растворы в пяти концентрациях от 30 МЕ/мл до 1,88 МЕ/мл, где каждое последующее разведение было двухкратным (30, 15, 7,5, 3,75, 1,88 МЕ/мл).

В отличие от условий приготовления иммуносорбента, которые описаны в монографии Европейской Фармакопеи, нами были подобраны следующие условия для приготовления иммуносорбента: снижение интенсивности центрифугирования при отмывании эритроцитов до 1200 g; добавление папаина в отношении 1:1 для гидролиза эритроцитов; увеличение температуры до 37˚С при выдерживании эритроцитов с папаином в течение 15 минут; увеличение

концентрации суспензии папаинизированных эритроцитов до 0,2% для последующей иммобилизации на твердой фазе.

При этом иммуносорбент готовили параллельно в разных планшетах с каждым фенотипом эритроцитов отдельно следующим образом. Отбирали по 3 мл эритроцитов каждого фенотипа в две отдельные пробирки. Проводили процедуру отмывания эритроцитов добавлением 10 мл ФБР (pH 7,4) в пробирку, последующим центрифугированием при 1200 g в течение 3 мин и удалением супернатанта. Процедуру отмывания повторяли 3 раза. Отмытые эритроциты подвергали гидролизу добавлением в отношении 1:1 10% раствора папаина в ФБР (pH 5,4) и инкубированием в течение 15 мин при температуре 37 ˚С. Затем эритроциты отмывали, как описано выше. Получали осадок отмытых папаинизированнных эритроцитов. Далее готовили 0,2% суспензию эритроцитов в ФБР (pH 7,0), содержащем глюкозу (0,18%), натрия цитрат (0,1%), натрий ЭДТА (0,07%) и борную кислоту (0,01%). Проводили иммобилизацию эритроцитов на поверхности твердой фазы путем внесения в лунки полистиролового планшета по 50 мкл суспензии эритроцитов. Для фиксации эритроцитов на твердой фазе планшет с внесенной суспензией эритроцитов центрифугировали при 120 g в течение 3 мин при температуре не более 8˚С, не допуская замораживания и образования кристаллов. Затем вносили в каждую лунку 100 мкл 0,05 % раствор глютаральдегида в ФБР (pH 7,4), выдерживали 10 мин и удаляли. Лунки планшетов промывали 3 раза добавлением 300 мкл ФБР (pH 7,4) в каждую лунку.

Проводили оценку содержания анти-D-Ат IgG в модельных образцах с известным содержанием определяемого вещества (15 МЕ/мл, 7,5 МЕ/Мл, 3,75 МЕ/мл) иммуноферментным методом с применением эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 в соответствии с описанием в ЕФ: вносили в лунки по 250 мкл раствора 20 г/л БСА для блокирования неспецифического связывания, выдерживали 30 мин, затем удаляли; далее в трех повторностях вносили по 35 мкл разведений стандартного и испытуемого образцов и добавляли в каждую лунку по 35 мкл раствора моноклональных Ат (BioBrad-5) инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°С, образованные комплексы Аг-Ат трехкратно

отмывали ФБР с pH 7,4; для выявления образованных комплексов последовательно вносили по 50 мкл авидин-стрептавидина, конъюгированного с щелочной фосфатазой, выдерживали 30 мин, затем удаляли, трехкратно планшет промывали и вносили по 100 мкл субстрата паранитрофенилфосфата, выдерживали в темном месте 10 мин; реакцию останавливали внесением в лунки 50 мкл 3М раствора натрия гидроксида. Результаты ИФА с применением иммуносорбентов, приготовленных с эритроцитами фенотипов R1R1 и R2R2, представлены на рисунках 1 и 2 соответственно.

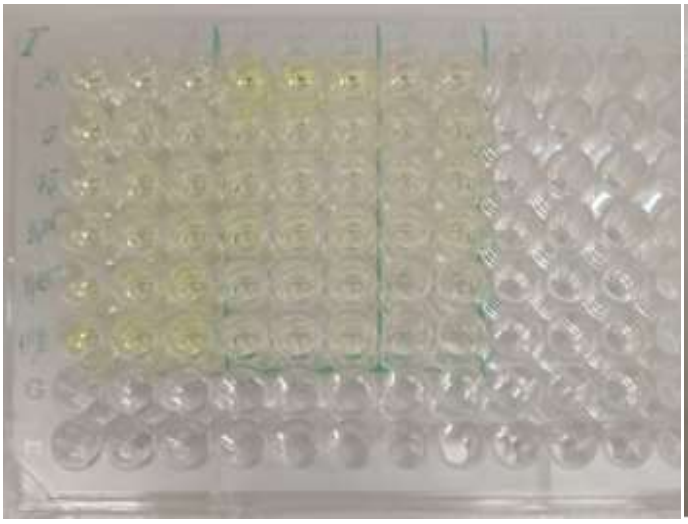


Рисунок. 1. Результаты ИФА с применением иммуносорбента, приготовленного с эритроцитами фенотипа R1R1

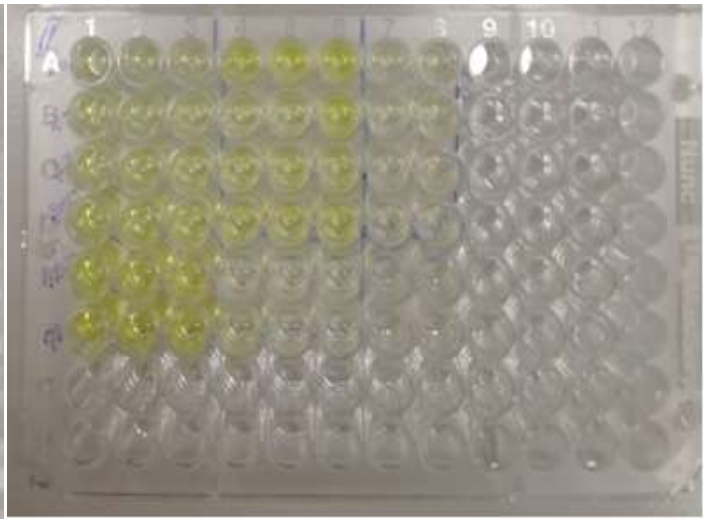


Рисунок. 2. Результаты ИФА с применением иммуносорбента, приготовленного с эритроцитами фенотипа R2R2

Для анализа выбраны значения концентраций модельных образцов в середине калибровочного диапазона (от 15 МЕ/мл до 3,75 МЕ/мл), проведено по 12 определений для каждой концентрации модельного образца. Для оценки сопоставимости полученных результатов определяли степень извлечения (r, %) анти-D-Ат IgG в испытуемых растворах для каждой концентрации и оценивали результат отклонением среднего результата определений ($C_{изм.}$) от значения,

принимаемого за истинное ($C_{теор.}$), определяли среднее значение и рассчитывали доверительный интервал при p=0,05. Результаты представлены в таблице 2.

Во всех испытаниях были получены удовлетворительные результаты — значения, принимаемые за истинные ($C_{теор.}$), лежат внутри диапазонов соответствующих средних результатов испытаний, при этом доверительный интервал средних значений степени извлечения для всех модельных образцов при применении эритроцитов фенотипа R1R1 составил (101,2% ± 5,09%), при применении эритроцитов фенотипа R2R2 составил (96,9% ± 12,5%).

Таким образом было установлено, подобранные условия позволили получать сопоставимые результаты количественного определения анти-D-Ат в модельных образцах с известным содержанием определяемого вещества иммуноферментным методом как при применении эритроцитов фенотипа R1R1, так и при применении фенотипа эритроцитов R2R2 для приготовления иммуносорбента.

Таблица - 2 Оценка сопоставимости результатов количественного определения анти-D-антител IgG иммуноферментным методом в модельных образцах при использовании эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 для приготовления иммуносорбента

$C_{теор}$, МЕ/мл	При применении фенотипа R1R1				При применении фенотипа R2R2			
	$C_{изм.}$,МЕ/мл	r, %	$r_{сред.}$, %	ДИ, p=0,05	$C_{изм.}$, МЕ/мл	r, %	$r_{сред}$ %	ДИ, p=0,05
15	14,87±2,11	99,1	101,2	101,2± 5,09	15,41±2,23	102,7	96,9	96,9± 12,5
7,5	7,59±4,58	101,2			11,01±4,79	94,4		
3,75	3,87±0,60	103,2			3,51±0,55	93,6		

Примечание: $C_{теор.}$ – значения содержания анти-D Ат, принимаемые за истинные; $C_{изм.}$– содержание анти-D Ат в испытуемых образцах; r - степень извлечения, $r_{сред.}$ - степень извлечения, среднее значение; ДИ - доверительный интервал.

3.2 Изучение особенностей иммобилизации D-положительных эритроцитов I(0) группы крови человека фенотипов R1R1 и R2R2 на поверхности твердой фазы в приготовленном иммуносорбенте

Для изучения особенностей иммобилизации эритроцитов R1R1 и R2R2 на твердой фазе в приготовленном иммуносорбенте подобранных условиях нами было проведено визуальное микроскопическое исследование. С помощью цифровой оптической микроскопии были получены микрофотографии иммуносорбентов, приготовленных с использованием каждого фенотипа эритроцитов (n = 96).

На микрофотографиях было видно, что эритроциты фенотипа R1R1 распределялись не равномерно, в форме агрегатов разной величины и плотности, выявлялись зоны с отсутствием покрытия (рисунок 3). Эритроциты фенотипа R2R2 образовывали более равномерный слой на поверхности твердой фазы (рисунок 4).

На пространственных морфометрических изображениях иммуносорбентов, полученных при обработке микроскопических снимков эритроцитов с применением аналитической программы для морфометрического анализа с визуализацией Image-Pro Premie Media Cybernetics в режиме 3D, площадь агрегированных эритроцитов фенотипа R1R1 занимала большую часть поверхности твердой фазы (пики желтого и красного цвета) (рисунок 5).

Площадь равномерного распределения эритроцитов фенотипа R2R2 (рисунок 6) составляла практически всю ее поверхность (пики зеленого цвета), что подтверждало различия в распределении эритроцитов на твердой фазе в зависимости от фенотипа.

Таким образом, было установлено, что при приготовлении иммуносорбента эритроциты фенотипа R2R2 распределялись на поверхности твердой фазы более равномерно, в отличие от эритроцитов фенотипа R1R1, которые проявляли склонность к агрегации, образуя более плотный слой.

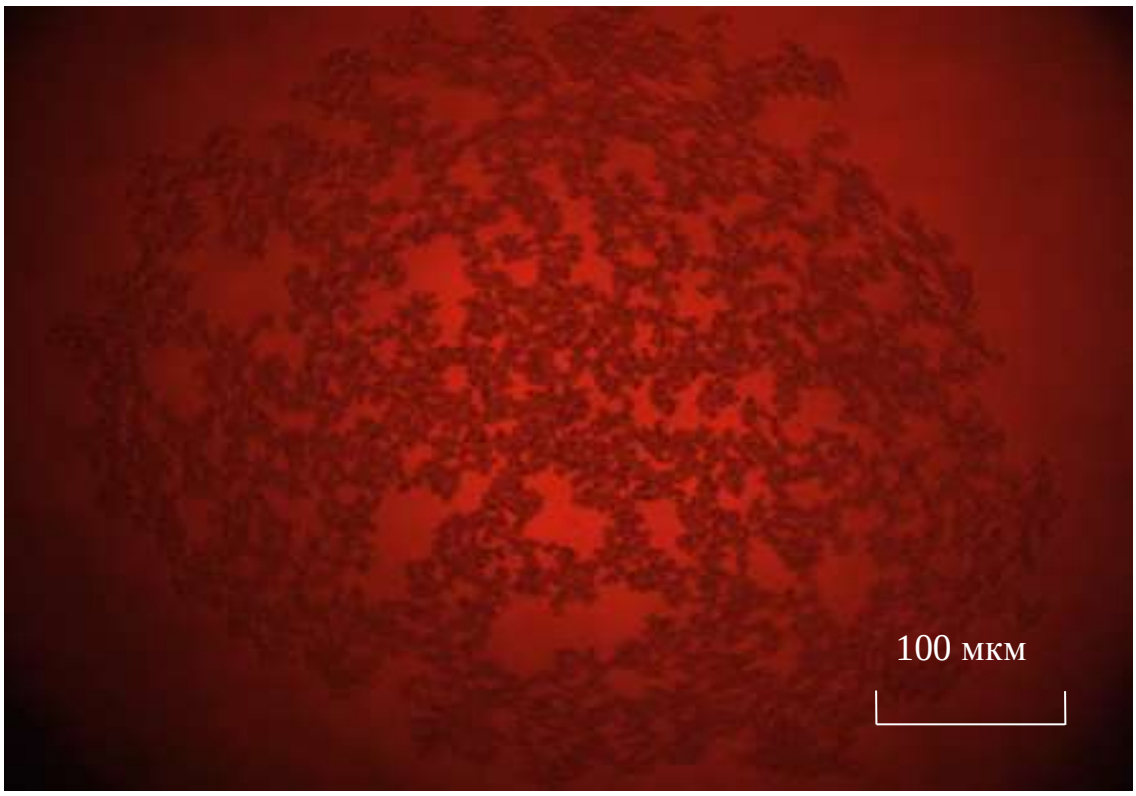


Рисунок. 3. Микрофотография эритроцитов фенотипа R1R1

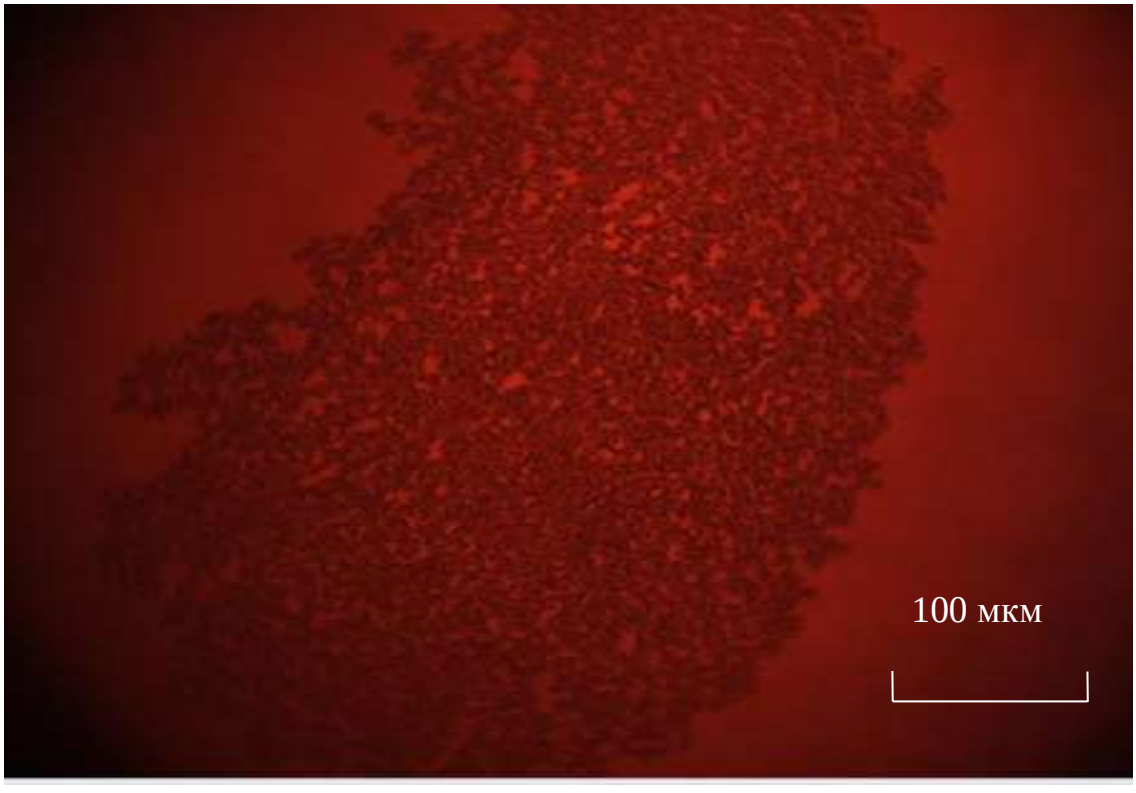


Рисунок 4. Микрофотография эритроцитов фенотипа R2R2

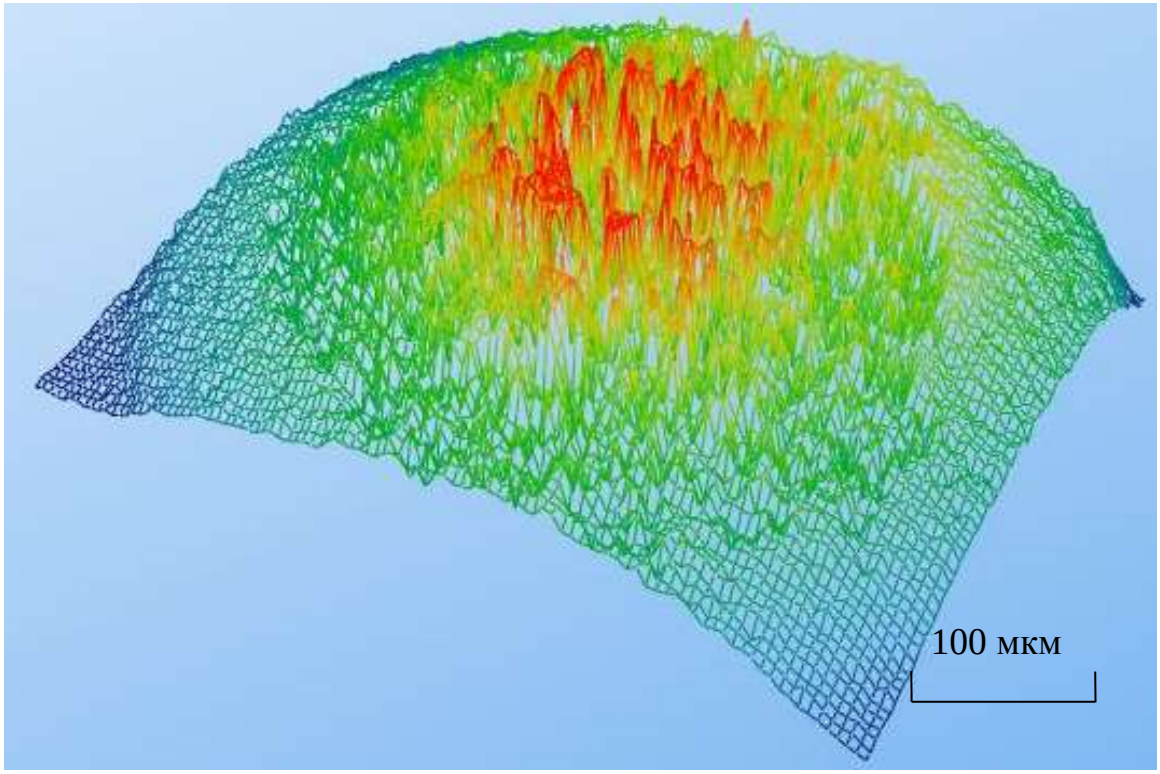


Рисунок 5. Пространственное морфометрическое изображение эритроцитов фенотипа R1R1

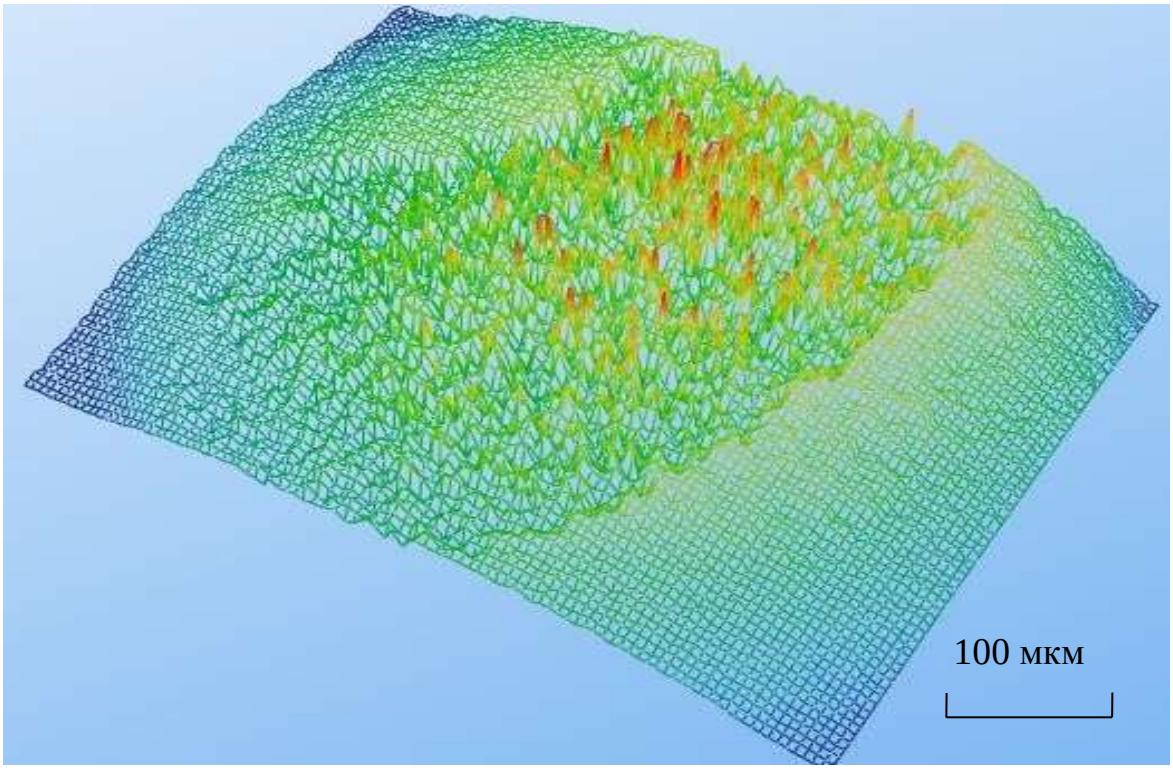


Рисунок 6.Пространственное морфометрическое изображение эритроцитов фенотипа R2R2

Указанные особенности подтверждались и при изучении пространственных морфометрических изображений, на которых интенсивно окрашивались зоны агрегации эритроцитов фенотипа R1R1.

Однако, проведенные исследования не позволяли нам провести количественную оценку распределения эритроцитов в приготовленном иммуносорбенте в связи с субъективностью методов.

Для стандартизации приготовления иммуносорбента требовалось определить характеристики для количественной оценки распределения эритроцитов и установить их значения.

3.3 Разработка критериев иммобилизации эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 на поверхности твердой фазы в приготовленном иммуносорбенте

Для количественной оценки распределения эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 на поверхности твердой фазы был проведен морфометрический анализ с построением гистограмм в автоматическом режиме.

На гистограммах (рисунок 7) площадь равномерного распределения (пик 3) эритроцитов изученных фенотипов составляла для эритроцитов фенотипа R1R1 – 234,00 ± 3,94 пикселей (пикс.), для эритроцитов фенотипа R2R2 – 191,9 ± 12,16 пикс.

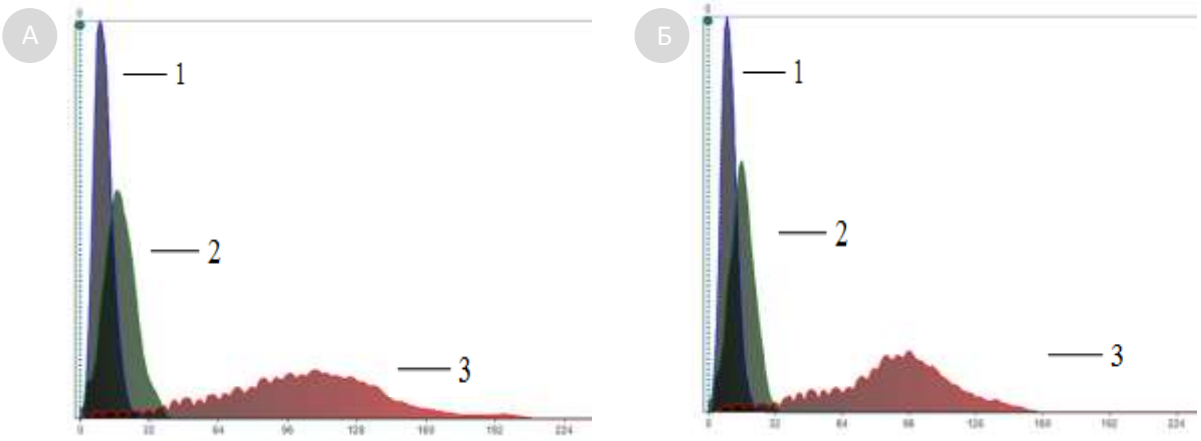


Рисунок 7. Гистограмма интенсивности распределения эритроцитов человека на твердой фазе. А – эритроциты фенотипа R1R1. Б –

эритроциты фенотипа R2R2. По оси ординат – интенсивность распределения эритроцитов (пикс.). Ось абсцисс – общая аналитическая площадь (пикс.). 1, 2, 3 – пики интенсивности распределения эритроцитов.

Относительная площадь ($S_{отн.}$, %), рассчитанная отношением значения (S3, пикс.), к общей аналитической площади ($S_{общ.}$ = 255 пикс.) по формуле (5) составляла для эритроцитов фенотипа R1R1 – (91,8 ± 3,6) % , для эритроцитов фенотипа R2R2 – (76,5 ± 7,5) %.

$$S_{отн.} = \frac{S3}{Sобщ.} \times 100\ \% \qquad (5)$$

Коэффициенты распределения ($К_{расп.}$), характеризующие плотность слоя агрегированных эритроцитов изученных фенотипов на твердой фазе, рассчитанные как отношение значения суммы площадей пиков S2 и S1 к суммарному значению площадей всех пиков ∑S по формуле (6) составляли 0,218–0,221 для фенотипа R1R1 и 0,229–0,231 для фенотипа R2R2 (таблица 3).

$$К_{расп.} = \frac{S2+S1}{\sum S} \qquad (6)$$

На основе анализа сопряженных экспериментальных данных, полученных при количественной оценке распределения эритроцитов в приготовленных с использованием эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 иммуносорбентах, и результатов количественного определения анти-D Ат методикой ИФА по отношению к 3-му МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ было установлено, что содержание анти-D Ат в растворах испытуемых образцов с известным содержанием анти-D Ат различались между собой незначительно (($U_{факт}$>$U_{крит}$), p= 0,05) и соответствовали критерию приемлемости (± 20%).

Таблица 3 - Площадь пиков распределения эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 на поверхности твердой фазы

Параметр	Фенотип эритроцитов					
	R1R1			R2R2		
	Диапазон значений (n = 48)	Среднее значение	R^2	Диапазон значений (n = 48)	Среднее значение	R^2
Площадь пика 1 (S1), пикс.	10,8–12,0	11,5	94,8	9,9–10,5	10,1	91,3
Площадь пика 1 относительная, %	8,32–8,58	8,46	92,6	8,5–9,0	8,5	91,8
Площадь пика 2 (S2), пикс.	18,5–20,6	19,4	91,8	15,7–17,5	16,4	94,0
Площадь пика 2 относительная, %	14,2–14,3	14,24	90,1	14,1–14,2	14,5	92,4
Площадь пика 3 (S3), пикс.	100,7–110,9	105,3	97,3	84,8–94,0	89,3	98,0
Площадь пика 3 относительная, %	77,2–77,5	77,3	91,9	76,8–77,4	77,0	91,9
Площадь пиков общая (∑S), пикс.	130,0–143,5	136,2	97,9	110,5–122,5	115,8	97,3
Коэффициент распределения	0,218–0,221	0,219	90,3	0,229-0,231	0,230	94,2
Примечание: n - количество определений; R^2 - коэффициент апроксимации						

При этом относительная площадь распределения эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 составляла (91,8 ± 3,6) и (76,5 ± 7,5) %, коэффициент распределения эритроцитов – (0,219 ± 0,001) и (0,229 ± 0,0014) соответственно.

Результаты оценки содержания анти-D Ат в растворах модельных образцов с известным содержанием определяемого вещества с использованием эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 для приготовления иммуносорбента представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Результаты оценки содержания анти-D антител в растворах испытуемых образцов с использованием эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2

Фенотип	$C_{теор}$, МЕ/мл	$C_{изм}$, МЕ/мл	$U_ф$	U_k	r, %	$S_{отн.}$, %	$K_{расп.}$
R1R1	30	30,7 ± 3,34	15	3	97,9	91,8 ± 2,8	0,220 ± 0,0011
	15	14,87 ± 2,11	15		99,1	92,29 ± 2,97	0,221 ± 0,0014
	7,5	7,59 ± 4,58	16		101,21	90,46 ± 4,73	0,218 ± 0,0029
	3,75	3,87 ± 0,60	12		103,23	92,55 ± 1,36	0,220 ± 0,0008
	1,88	1,82 ± 0,61	12		89,89	90,78 ± 2,12	0,221 ± 0,0012
Средние значения					98,2 ± 1,28	91,8 ± 3,6	0,219 ± 0,001
R2R2	30	28,93 ± 0,83	12	3	89,77	75,5 ± 7,4	0,230 ± 0,0010
	15	15,41 ± 2,23	15		102,74	76,5 ± 7,5	0,231 ± 0,0001
	7,5	11,01 ± 4,79	16		94,38	75,82 ± 5,8	0,229 ± 0,0002
	3,75	3,51 ± 0,55	12		93,59	75,82 ± 4,6	0,229 ± 0,0017
	1,88	2,04 ± 0,16	12		109,02	76,7 ± 5,2	0,230 ± 0,0010
Средние значения					97,9 ± 15,63	76,07 ± 6,1	0,229 ± 0,0014

Примечание: $C_{теор.}$ – значения содержания анти-D Ат, принимаемые за истинные; $C_{изм.}$ – содержание анти-D Ат в испытуемых образцах; $U_ф$ – фактическое значение U-критерия Манна-Уитни; $U_к$ – критическое значение U-критерия Манна-Уитни; r – степень извлечения анти-D Ат в испытуемых образцах; $S_{отн.}$ – относительная площадь; $K_{расп.}$ – коэффициент распределения.

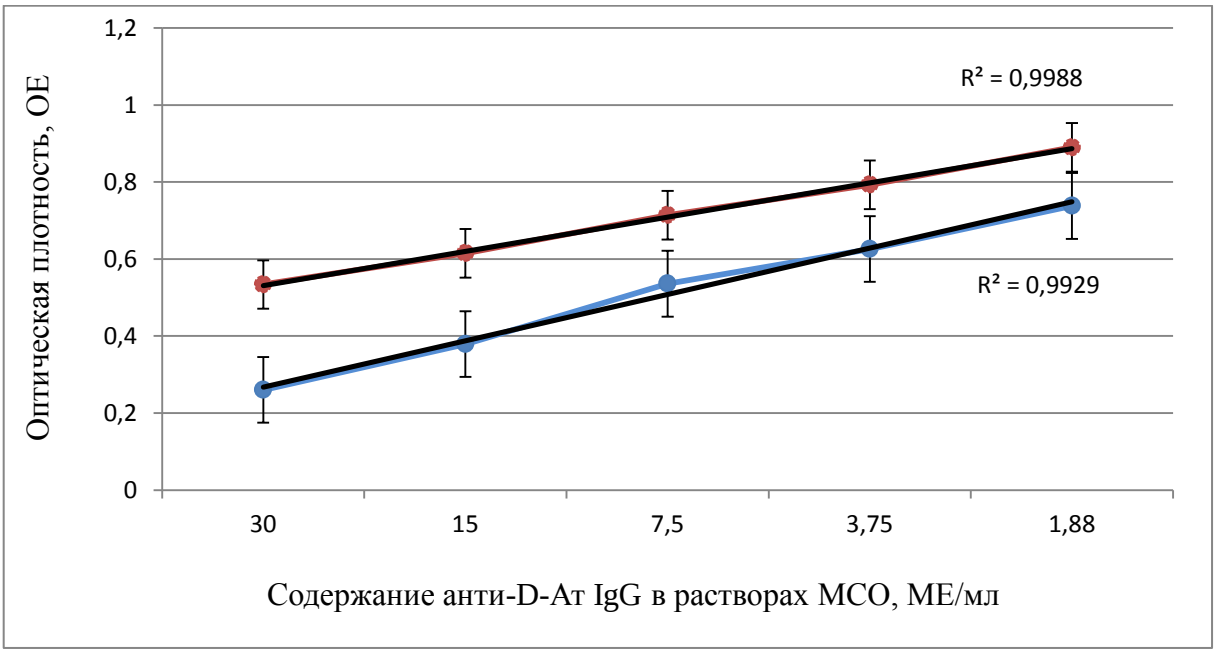
Было установлено, что средние значения содержания анти-D Ат в испытуемых образцах отличались незначительно ($U_{факт} > U_{крит}$, p= 0,01) и отвечали

критериям приемлемости (± 20 % от номинального значения) при следующих критериях иммобилизации:

– для эритроцитов фенотипа R1R1 $S_{отн.} \geq 88$ %, $К_{расп.} – \leq 0{,}22$;

– для эритроцитов фенотипа R2R2 $S_{отн.} \geq 70\%$, $К_{расп.} – \leq 0{,}23$.

При этом графики зависимости значений оптической плотности от содержания анти-D Ат в растворах МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ характеризовались линейностью, коэффициенты детерминации линейной регрессии (R^2) были ≥ 0,9, величина относительного стандартного отклонения (RSD, %) значений оптической плотности (ОЕ) не превышала 15 % и соответствовала установленным критериям приемлемости результатов (≤ 20 %), что подтверждало наличие линейной зависимости в аналитическом диапазоне от 1,88 до 30 МЕ/мл содержания анти-DAт (рисунок 8).



– при использовании эритроцитов фенотипа R1R1

– при использовании эритроцитов фенотипа R2R2

Рисунок 8. Оценка линейности аналитического диапазона

Таким образом, для количественной оценки распределения эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 на поверхности твердой фазы была рассчитана относительная площадь ($S_{отн.}$, %) равномерного распределения эритроцитов, выраженная в процентах по отношению к общей аналитической площади твердой фазы, суммарная площадь агрегированных эритроцитов изученных фенотипов ($\sum S$), а также коэффициент их распределения ($К_{расп.}$), характеризующий плотность слоя, образованного агрегированными эритроцитами.

Полученные значения использовали для установления критериев иммобилизации эритроцитов при определении содержания анти-D Ат в растворах испытуемых образцов с известным содержанием анти-D Ат методикой ИФА по отношению к МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ с использованием эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 для приготовления иммуносорбента.

Таким образом, в ходе исследования по изучению особенностей распределения эритроцитов, используемых в качестве Аг для иммобилизации на твердой фазе при приготовлении иммуносорбента для количественного определения анти-D Ат, были установлены следующие критерии иммобилизации:
- относительная площадь покрытия эритроцитами ($S_{отн.}$) - числовая характеристика, позволяющая количественно оценить распределение эритроцитов на поверхности твердой фазы готового иммуносорбента, выраженная в процентах по отношению к общей аналитической площади твердой фазы и должна быть. ≤ 88 % для эритроцитов фенотипа R1R1, и ≤ 70 % для эритроцитов фенотипа R2R2;
- коэффициент распределения эритроцитов ($К_{расп.}$) - числовой показатель, позволяющий количественно оценить плотность слоя, образованного агрегированными эритроцитами на поверхности твердой фазы готового иммуносорбента, выраженный как отношение количества агрегированных эритроцитов к количеству не агрегированных эритроцитов на поверхности твердой фазы, при этом для эритроцитов фенотипа R1R1 $К_{расп.}$ должен быть ≤ 0,22, для эритроцитов фенотипа R2R2 должен быть ≤ 0,23 [35].

Показано, что приготовление иммуносорбента с применением как эритроцитов фенотипа R2R2, так и эритроцитов фенотипа R1R1 в выбранных

условиях позволяет получать воспроизводимые результаты оценки содержания анти-D Ат методикой ИФА.

3.4 Валидация усовершенствованной методики иммуноферментного анализа количественного определения анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D)

Для подтверждения возможности использования эритроцитов фенотипа R1R1 как альтернативного фенотипу R2R2 необходимо было провести валидационные исследования, направленные на экспериментальное доказательство пригодности фенотипа R1R1 для использования при количественном определении анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D), различных по составу, лекарственной форме и пути введения, в соответствии с требованиями, предъявляемыми к разработке и валидации биоаналитических методов, основанных на образовании иммунных комплексов Аг-Ат.

В качестве испытуемых образцов были выбраны лекарственные препараты ИГЧ антирезус Rh_o(D):

- лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения, 150 мкг (750 МЕ) с содержанием в 1 мл восстановленного раствора иммуноглобулинов G не менее 90%, глицина 22,5 мг, натрия хлорида 9,0 мг (препарат № 1);
- раствор для внутривенного введения, 1500 МЕ (300 мкг)/2 мл с содержанием в 1 мл иммуноглобулинов G не менее 95%, глицина 20,6 мг, натрия хлорида не более 0,250 ммоль и альбумина человека 10 мг (препарат № 2).

Процедура валидации, валидационные характеристики количественного определения анти-D Ат методикой ИФА и критерии приемлемости для оценки валидационных характеристик были определены в соответствии с требованиями и рекомендациями нормативных документов международных регуляторных

органов (ICH, ЕАЭС, FDA, EMA) [37,44,59,72]. Установленные для валидации параметры представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Установленные валидационные параметры для количественного определения анти-D антител в препаратах иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$ методикой иммуноферментного анализа

Валидационная характеристика	Критерии приемлемости
1	2
Правильность (точность)	Степень извлечения (r, %) анти-D Ат в модельных образцах, приготовленных путем добавления раствора МСО в раствор стандартного образца иммуноглобулина человека нормального, не содержащего анти-D Ат, должно находиться в диапазоне (±20)% относительно добавленного количества ($C_{теор.}$).
Промежуточная прецизионность (внутрилабораторная воспроизводимость и повторяемость)	1. Величина (RSD,%) значений содержания анти-D Ат, полученных на 12 образцах двумя аналитиками в разные дни (по 3 образца препаратов №№ 1,2 каждым аналитиком в 3 дня) должна быть(≤20)%. 2. Содержание анти-D Ат в испытуемых образцах препаратов №№ 1,2, определенное каждым аналитиком, должно находиться в диапазоне (±20)% от номинального значения.
Линейность аналитического диапазона	Графики зависимости значений оптической плотности от содержания анти-D Ат в растворах МСО визуально должны характеризоваться линейностью в диапазоне от 1,8 до 30 МЕ/мл, коэффициенты детерминации (R^2) линейной регрессии должны быть (≥0,9).
Селективность и специфичность	1. Содержание анти-D Ат в испытуемых образцах препаратов №№ 1,2 содержащих глицин, натрия хлорид, альбумин человека, должно находиться в диапазоне (±20)% от номинального значения. 2. Конкуренция между компонентами реакции: стандартный образец иммуноглобулина человека нормального, не содержащего анти-D Ат, и

Продолжение таблицы 5

1	2
	моноклональными анти-D Ат при их внесении в лунки иммуносорбента, приготовленного с использованием эритроцитов фенотипа R1R1, должна отсутствовать. 3. Внесение растворов МСО и испытуемых образцов в лунки иммуносорбента, приготовленного с использованием эритроцитов резус-отрицательного фенотипа rr не должно образовывать комплекса Аг-Ат.
Сопоставимость результатов при применении эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2	Значимость различий данных при оценке независимых выборок с помощью t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна Уитни количественного определения анти-D-Ат IgG в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ №№ 1,2, полученных в условиях оценки промежуточной прецизионности с использованием эритроцитов фенотипов R1R1и R2R2, должна отсутствовать.
Примечание: Ат – антитела; Аг – антигены; МСО – международный стандартный образец анти-D иммуноглобулина ВОЗ; *r* – степень извлечения анти-D Ат в испытуемых образцах; $C_{теор.}$ – значения содержания анти-D Ат, принимаемые за истинные, *RSD* – относительное стандартное отклонение, R^2 – коэффициент детерминации.	

Оценку правильности (точности) количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ с использованием эритроцитов фенотипа R1R1 проводили с использованием МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ и модельных смесей с известным содержанием определяемого вещества. Рассчитывали средние значения степени извлечения (r, %) анти-D Ат в испытуемых растворах для каждой концентрации, а затем среднее значение для пяти испытуемых растворов. Оценивали результат отклонением среднего результата определений ($C_{изм.}$) от значения, принимаемого за истинное ($C_{теор.}$). Результаты оценки правильности представлены в таблице 6.

Во всех испытаниях получены удовлетворительные результаты – значения принимаемые за истинные ($C_{теор.}$), лежат внутри доверительного интервала соответствующих средних результатов испытаний, полученных экспериментально данной методикой. Результаты оценки содержания анти-D Ат в испытуемых образцах соответствуют установленному критерию приемлемости (±20%).

Таблица 6 - Результаты оценки правильности количественного определения анти-D антител методикой иммуноферментного анализа с использованием эритроцитов фенотипа R1R1

Фено-тип эритро-цитов	$C_{теор}$, МЕ/мл	$C_{изм}$, МЕ/мл	$U_ф$	$U_к$	r, %	Средние значения, %	ДИ (P=95%), %
R1R1	30	30,7±3,34	16	3	102,37	100,5	100,5±5,37
	15	14,87±2,11	15		99,1		
	7,5	7,59±4,58	16		101,21		
	3,75	3,87±0,60	12		103,23		
	1,88	1,82±0,61	12		96,57		

Примечание: $C_{теор.}$ – значения содержания анти-D Ат, принимаемые за истинные; $C_{изм.}$ – содержание анти-D Ат в испытуемых образцах; $U_ф$ – фактическое значение; U-критерия Манна-Уитни; $U_к$ – критическое значение U-критерия Манна-Уитни; r – степень извлечения анти-D Ат в испытуемых образцах; ДИ – доверительный интервал.

Оценку промежуточной прецизионности (внутрилабораторной воспроизводимости и повторяемости) количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ с использованием эритроцитов фенотипа R1R1 проводили в разные дни два аналитика. Проводили по 6 испытаний на лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ №№ 1,2 с одинаковым содержанием анти-D Ат в 1 мл – 750 МЕ. Общее количество испытаний – 12. Результаты оценки промежуточной прецизионности представлены в таблице 7.

Таблица 7 -Результаты оценки промежуточной прецизионности количественного определения анти-D антител с использованием эритроцитов фенотипа R1R1

Ана-литик	Препа-рат	Дни	$C_{изм}$, МЕ/мл	Средние значения, МЕ/мл	SD	RSD, %	$RSD_{сред.}$, %	ДИ (P=0,95), МЕ/мл
1	№1	1	754	750,4	26,56	3,54	6,48	±21,25
		2	792					
		3	739					
	№2	1	753,5					
		2	754					
		3	710					
2	№1	1	734	737,5	65,6	8,89		±52,49
		2	686					
		3	807					
	№2	1	770					
		2	791					
		3	637					
Примечание: $C_{изм.}$ – содержание анти-D Ат в испытуемых образцах; SD – стандартное отклонение; RSD – относительное стандартное отклонение; ДИ – доверительный интервал.								

Прецизионность подтверждалась соответствием полученных результатов установленным критериям приемлемости: величина (RSD, %) значений содержания анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D), полученных на 6 образцах каждым аналитиком составила менее 20% (3,54% и 8,89%); величина (RSD,%) значений содержания анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D), полученных на 12 образцах составила менее 20% (6,48%); значения содержания анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D), определенные каждым аналитиком (аналитик 1 – от 729,15 МЕ/мл до 771,65 МЕ/мл, аналитик 2 – от 685,01 МЕ/мл до 789,99 МЕ/мл), находятся в диапазоне (±20%) или от 600 до 900 МЕ/мл от номинального значения (750 МЕ/мл), что соответствует установленным критериям приемлемости результатов. Таким образом, методика ИФА количественного

определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ с использованием эритроцитов фенотипа R1R1 обладает прецизионностью.

Оценку линейности аналитического диапазона количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ методикой ИФА с использованием эритроцитов фенотипа R1R1 проводили десятью испытаниями с применением растворов МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ, содержащих 30, 15, 7,5, 3,75, 1,88 МЕ/мл анти-D Ат. Результаты оценки линейности представлены в таблице 8.

Величина (RSD, %) значений оптической плотности растворов МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ не превышала 11,0% и соответствовала установленным критериям приемлемости результатов (≤20%). Графики зависимости значений оптической плотности от значений содержания анти-D Ат в растворах МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ характеризовались линейностью, коэффициенты детерминации линейной регрессии (R^2) были не менее 0,9 (рисунок 9), что свидетельствовало о наличии линейной зависимости в аналитическом диапазоне содержания анти-D Ат от 1,88 до 30 МЕ/мл.

Таблица 8 - Результаты оценки линейности аналитического диапазона количественного определения анти-D антител методикой иммуноферментного анализа с использованием эритроцитов фенотипа R1R1

$C_{МСО}$, МЕ/мл	Оптическая плотность растворов МСО, ОЕ	RSD, %
1,88	0,738±0,017	2,3
3,75	0,626±0,021	3,5
7,5	0,536±0,026	4,8
15	0,379±0,024	5,8
30	0,260±0,025	11,0
Примечание: МСО – международный стандартный образец анти-D иммуноглобулина ВОЗ; $C_{МСО}$ – содержание анти-D Ат в растворах МСО; ОЕ – относительные единицы; RSD – относительное стандартное отклонение.		

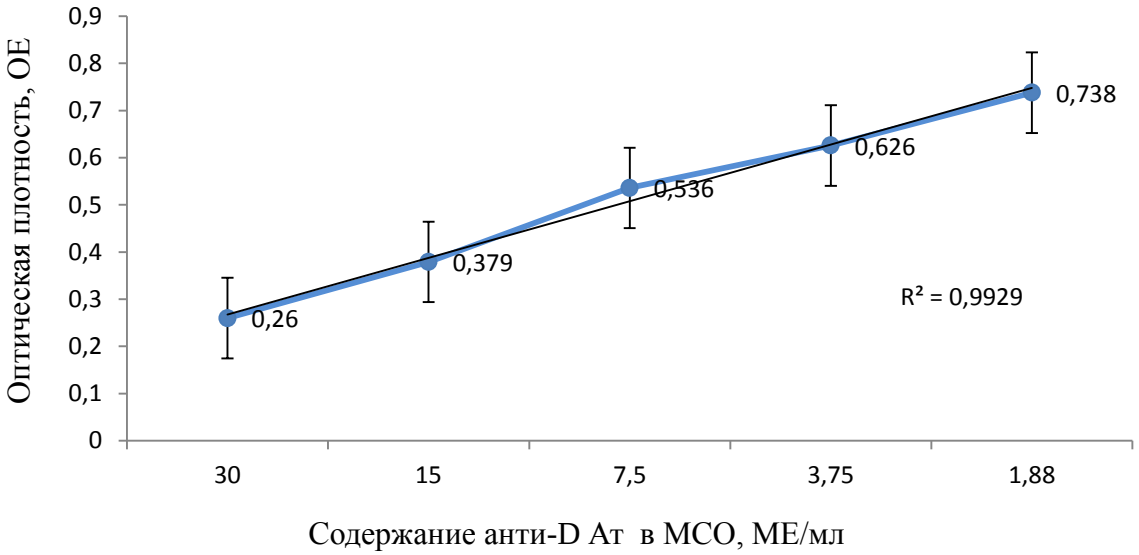


Рисунок 9. График зависимости значений оптической плотности от значений содержания анти-D антител в растворах международного стандартного образца при коэффициенте детерминации $R^2 \geq 0{,}9$.

— при использовании эритроцитов фенотипа R1R1.

— - линия тренда средних значений при n = 10.

Оценку селективности и специфичности количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ с использованием эритроцитов фенотипа R1R1 рассматривали как способность методики ИФА однозначно оценивать содержание анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ в присутствии сопутствующих компонентов. Селективность и специфичность подтверждалась соответствием критериям приемлемости результатов, подтверждающих, что входящие в состав препаратов дополнительные вещества (стабилизаторы – глицин, натрия хлорид, альбумин человека) не влияют на количественное определение содержания анти-D Ат (таблица 9).

Таблица 9 - Результаты оценки количественного определения анти-D антител в препарате № 1 с помощью иммуносорбента, приготовленного с использованием эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2

Фенотип эритро-цитов	$C_{изм.}$, МЕ/мл	Среднее значение, МЕ/мл	SD	RSD, %	ДИ (P=95 %), МЕ/мл	$t_{теор.}$	$t_{ф.}$
R1R1	754	758,56	72,15	9,51	±47,14	2,30	1,24
	734						
	686						
	792						
	844						
	807						
	739						
	844						
	627						
R2R2	748	798,78	51,71	6,47	±33,78		
	730						
	833						
	794						
	792						
	891						
	776						
	771						
	854						

Примечание: $C_{изм.}$– содержание анти-D Ат препарате № 1; SD – стандартное отклонение; RSD – относительное стандартное отклонение; ДИ – доверительный интервал; $t_{теор.}$-теоретическое значение t-критерия Стьюдента; $t_{ф.}$– фактическое значение t-критерия Стьюдента.

При параллельном воспроизведении иммуноферментного метода в качестве испытуемого образца использовали раствор стандартного образца иммуноглобулина человека нормального, не содержащего анти-D Ат. При его применении наблюдалось отсутствие конкуренции с биотинилированными моноклональными анти-D Ат, что подтверждалось развитием яркого

окрашивания реакционной смеси после внесения стоп-реагента, а также высокими значениями оптической плотности (ОЕ>2, n=10) при учете результатов с использованием спектрофотометра.

При параллельном воспроизведении методики при внесении растворов МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ, испытуемых образцов и биотинилированных моноклональных анти-D Ат в лунки иммуносорбента, приготовленного с использованием D-отрицательных эритроцитов фенотипа rr, не наблюдалось образования комплексов антиген-антитело, что подтверждалось отсутствием окрашивания реакционной смеси после внесения стоп-реагента при визуальной оценке, а также значениями оптической плотности значительно ниже аналитического диапазона определения – (0,050±0,007) ОЕ (*n*=10), при учете результатов с использованием спектрофотометра.

Таким образом, продемонстрирована специфичность количественного определения анти-D Ат методикой ИФА в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) с использованием эритроцитов фенотипа R1R1.

Оценку устойчивости методики и сопоставимость результатов проводили для подтверждения возможности применения эритроцитов фенотипа R1R1 как альтернативного фенотипу R2R2 при количественном определении анти-D Ат методикой ИФА. Для этого готовили иммуносорбент с использованием эритроцитов двух фенотипов и определяли содержание анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) различного состава для внутримышечного (препарат № 1) и внутривенного (препарат № 2) введения (по 18 определений для каждого препарата). Результаты оценки количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) представлены в таблицах 9 и 10 и на рисунке 10.

Возможность применения эритроцитов фенотипа R1R1 как альтернативного фенотипу R2R2 для количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) методикой ИФА подтверждалась отсутствием статистической значимости различий данных при оценке независимых выборок (результаты количественного определения анти-D Ат в препаратах №№ 1,2).

С помощью t-критерия Стьюдента показано, что для препарата № 1 $t_{ф.}$=1,24 меньше $t_{теор.}$=2,30 (табличного при P=95%), для препарата № 2 $t_{ф.}$=0,79 меньше $t_{теор.}$=2,30 (табличного при P=95%). Далее с помощью U-критерия Манна-Уитни для независимых групп данных для двух препаратов было установлено, что $U_к$=18 меньше $U_ф$=21.

Таблица 10 - Результаты оценки количественного определения анти-D антител в препарате № 2 с помощью иммуносорбента, приготовленного с использованием эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2

Фенотип эритро-цитов	$C_{изм.}$, МЕ/мл	Среднее значение, МЕ/мл	SD	RSD, %	ДИ (P=95 %), МЕ/мл	$t_{теор.}$	$t_{ф.}$
R1R1	753,5	779,17	80,8	10,37	±52,79	2,30	0,79
	754						
	791						
	637						
	710						
	770						
	890						
	888						
	819						
R2R2	763	751,94	78,03	10,38	±50,98		
	883						
	681						
	700						
	674						
	743,5						
	763						
	691						
	869						

Примечание: $C_{изм.}$– содержание анти-D Ат препарате № 1; SD – стандартное отклонение; RSD – относительное стандартное отклонение; ДИ –доверительный интервал; $t_{теор.}$- теоретическое значение t-критерия Стьюдента; $t_{ф.}$– фактическое значение t-критерия Стьюдента.

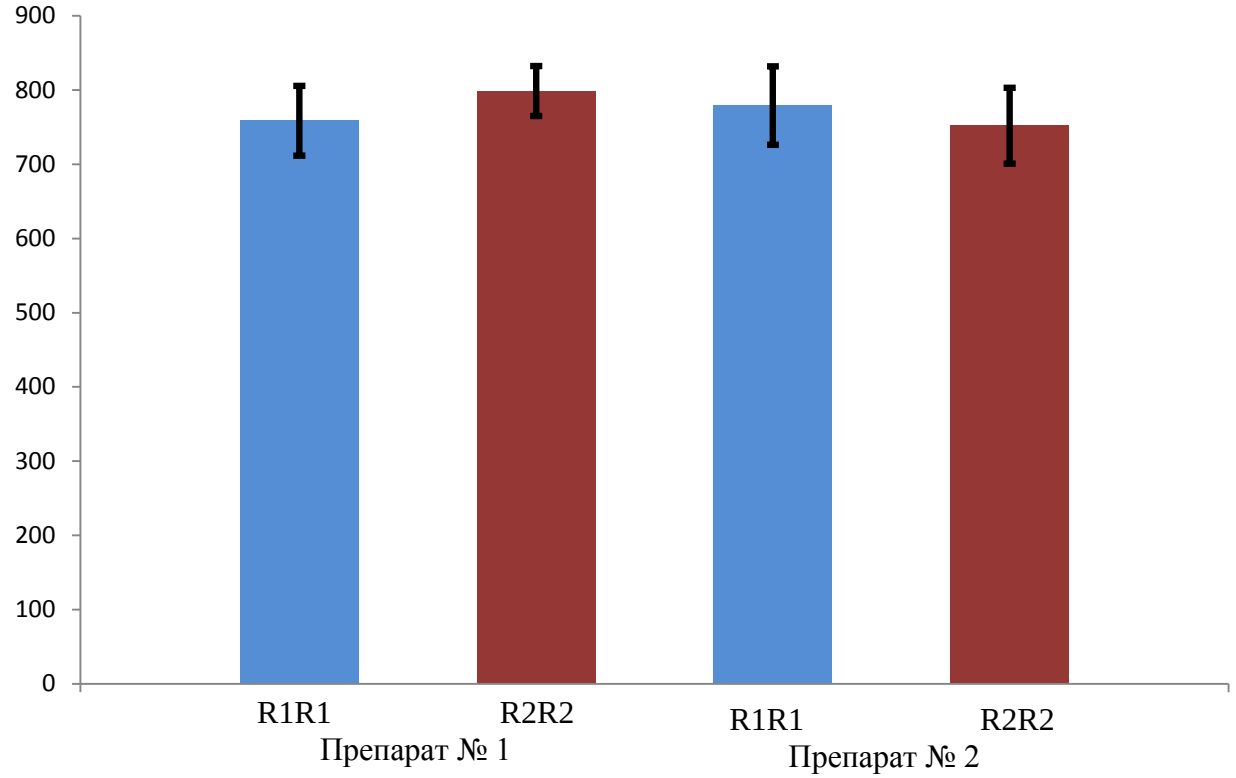


Рисунок 10. Результаты оценки устойчивости методики и сопоставимости результатов при количественном определении анти-D антител в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) с использованием эритроцитов фенотипа R1R1 и R2R2. По оси ординат – содержание анти-D антител, МЕ/мл. По оси абсцисс – фенотип эритроцитов в зависимости от препарата.

Проведенная валидация количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) методикой ИФА по ключевым параметрам: правильность, промежуточная прецизионность (повторяемость и внутрилабораторная воспроизводимость), линейность аналитического диапазона, селективность, специфичность, устойчивость методики и сопоставимость результатов при использовании эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 позволила установить следующие критерии приемлемости оценки результатов: 1)

относительные значения содержания анти-D Ат в испытуемом образце должны быть в интервале от 80 до 120% (±20%) от номинального (установленного) значения; 2) при построении графика зависимости значений оптической плотности от значений содержания анти-D Ат в растворах МСО анти-D иммуноглобулина коэффициент детерминации (R^2) линейной регрессии должен быть не менее 0,9; 3) относительное стандартное отклонение (*RSD*,%) трех значений оптической плотности, ОЕ для каждой концентрации не должно превышать 20% [52].

3.5 Оценка точности и прецизионности количественного определения анти-D антител при проведении международного межлабораторного исследования подтверждения квалификации усовершенствованной методики иммуноферментного анализа

В декабре 2021 года лаборатория испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических лекарственных препаратов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России наряду с 14 лабораториями разных стран мира приняла участие в международном межлабораторном исследовании по подтверждению квалификации метода количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) (Proficiency Testing Scheme «PTS 223: Human anti-D immunoglobulin assay»), организованном Европейским директоратом по качеству лекарственных средств [68].

Цель исследования по подтверждению квалификации - оценка компетентности лаборатории, основанное на международном межлабораторном сравнительном анализе. Участие в международных межлабораторных исследованиях подтверждения квалификации методики является для контрольно-аналитических лабораторий объективным инструментом оценки точности и прецизионности получаемых ими данных.

Исследования подтверждения квалификации методики охватывают всю деятельность лаборатории, начиная с приёмки и хранения образцов,

экспериментальной работы в лаборатории, интерпретации данных, заканчивая внесением данных и заключений в регистрационные формы. Ошибки на любом из этих этапов влияют на квалификацию лаборатории. Поэтому в отчёт о проведенном исследовании не вносятся изменения, если лаборатория обнаруживает какую-либо ошибку после ознакомления с предварительным отчётом, полученным от научного консультанта EDQM. Комментарии, полученные от лаборатории, включаются в итоговый отчёт, однако таблицы, цифровые данные и заключения не могут быть изменены, за исключением тех случаев, когда ошибка возникла в результате неправильной интерпретации данных сотрудником EDQM.

В соответствии с дизайном исследования, разработанным специалистами EDQM, участники исследования должны были определить содержание анти-D Ат в четырех контрольных испытуемых образцах с неизвестным содержанием определяемого вещества, предоставленных EDQM, любым из трех методов, предназначенных для количественной оценки анти-D Ат: автоматизированной гемагглютинации, проточной цитофлуориметрии или ИФА [69].

Для контрольного испытуемого образца № 1 (1 мл в ампуле) предполагалось только одно количественное определение в информационных целях. По три количественных определения должны были проводиться на контрольных испытуемых образцах №№ 2, 3 и 4 (по 2 мл в ампуле) с интервалом не менее одного дня.

Испытания считались пройденными, если целевое относительное стандартное отклонение (Target RSD) составляло не более 10% от содержания анти-D Ат в контрольном испытуемом образце, выраженном в МЕ/мл, а также если были получены удовлетворительные показатели стандартизованной оценки (z-score $< \pm 3$) для всех результатов испытаний.

Нами было проведено исследование усовершенствованной методикой ИФА в соответствии с требованиями организатора международных межлабораторных испытаний. Результаты исследования представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Результаты исследования подтверждения квалификации количественного определения анти-D антител в контрольных испытуемых образцах с неизвестным содержанием определяемого вещества

Номер количест-венного определения анти-D Ат	Результаты определения анти-D Ат в контрольных испытуемых образцах с неизвестным содержанием определяемого вещества, МЕ/мл			
	КИО № 1	КИО № 2	КИО № 3	КИО № 4
1	103	853	586	901
2	-	858	617	905
3	-	934	613	956
Хср, МЕ/мл	-	882	605	921
Примечание: КИО – контрольный испытуемый образец, Хср - среднее значение				

Сравнительный анализ результатов определения анти-D Ат в контрольных испытуемых образцах, полученных иммуноферментным методом в лаборатории ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, и данных о значениях содержания анти-D Ат в контрольных испытуемых образцах, полученных из EDQM, позволил сделать вывод о том, что экспериментально полученные в лаборатории значения соответствуют установленным данным EDQM и удовлетворяют требованиям к правильности полученных результатов протокола EDQM PTS 223: «Human anti-D immunoglobulin assay», а также демонстрируют точность результатов. Оценка результатов проведенного исследования представлена в таблице 12.

Таблица 12 – Результаты исследования подтверждения квалификации количественного определения анти-D антител в контрольных испытуемых образцах с неизвестным содержанием определяемого вещества в лаборатории ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

№ КИО	$C_{теор.}$ по данным EDQM, МЕ/мл	Результаты, полученные экспериментально в лаборатории ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России				Вывод
		$C_{изм.}$, МЕ/мл	SD	целевое RSD, %	z-score	
2	885	882	45	5	0,0	Соответствует
3	584	605	17	3	0,4	Соответствует
4	885	921	31	3	0,4	Соответствует

Примечание: КИО – контрольный испытуемый образец; $C_{теор.}$ - содержание анти-D Ат в КИО по данным EDQM; SD – стандартное отклонение; RSD – относительное стандартное отклонение; z-score - показатель стандартизованной оценки.

Сравнительный анализ результатов определения анти-D Ат в контрольных испытуемых образцах, полученных в лаборатории ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, и результатов определения анти-D Ат в контрольных испытуемых образцах с различным содержанием определяемого вещества, полученных в других 14 лабораториях, принимавших участие в международном межлабораторном исследовании, показал, что усовершенствованная методика ИФА обладает достаточной прецизионностью (рисунок 11).

Результаты оценки прецизионности количественного определения анти-D Ат в контрольных испытуемых образцах, содержащих различное количество определяемого вещества представлены на рисунке 12.

Таким образом, в ходе международного межлабораторного исследования по подтверждению квалификации количественного определения анти-D Ат подтверждены точность и прецизионность примененной методики. Полученные

данные демонстрируют надежность результатов количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ усовершенствованной методикой ИФА.

По итогам проведенного исследования получено заключение Европейского директората по качеству лекарственных средств (EDQM) об успешном участии в международных испытаниях PTS223: «Human anti-D immunoglobulin» от 29.04.2022 [66] (Приложение А).

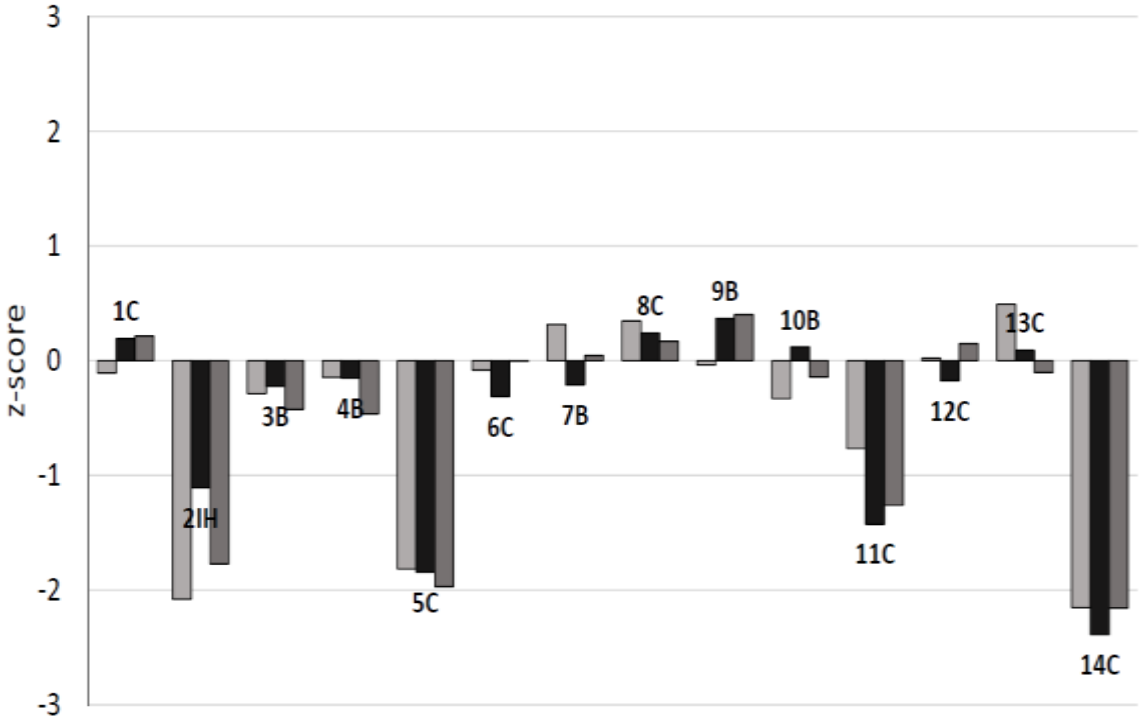


Рисунок 11. Сравнительная оценка результатов исследования подтверждения квалификации количественного определения анти-D-антител IgG. По оси ординат - показатель стандартизированной оценки (z-core). По оси абсцисс - код лаборатории–участника в международных межлабораторных испытаний: код лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 9. А - метод гемагглютинации. В - иммуноферментный метод. С - метод проточной цитофлуориметрии

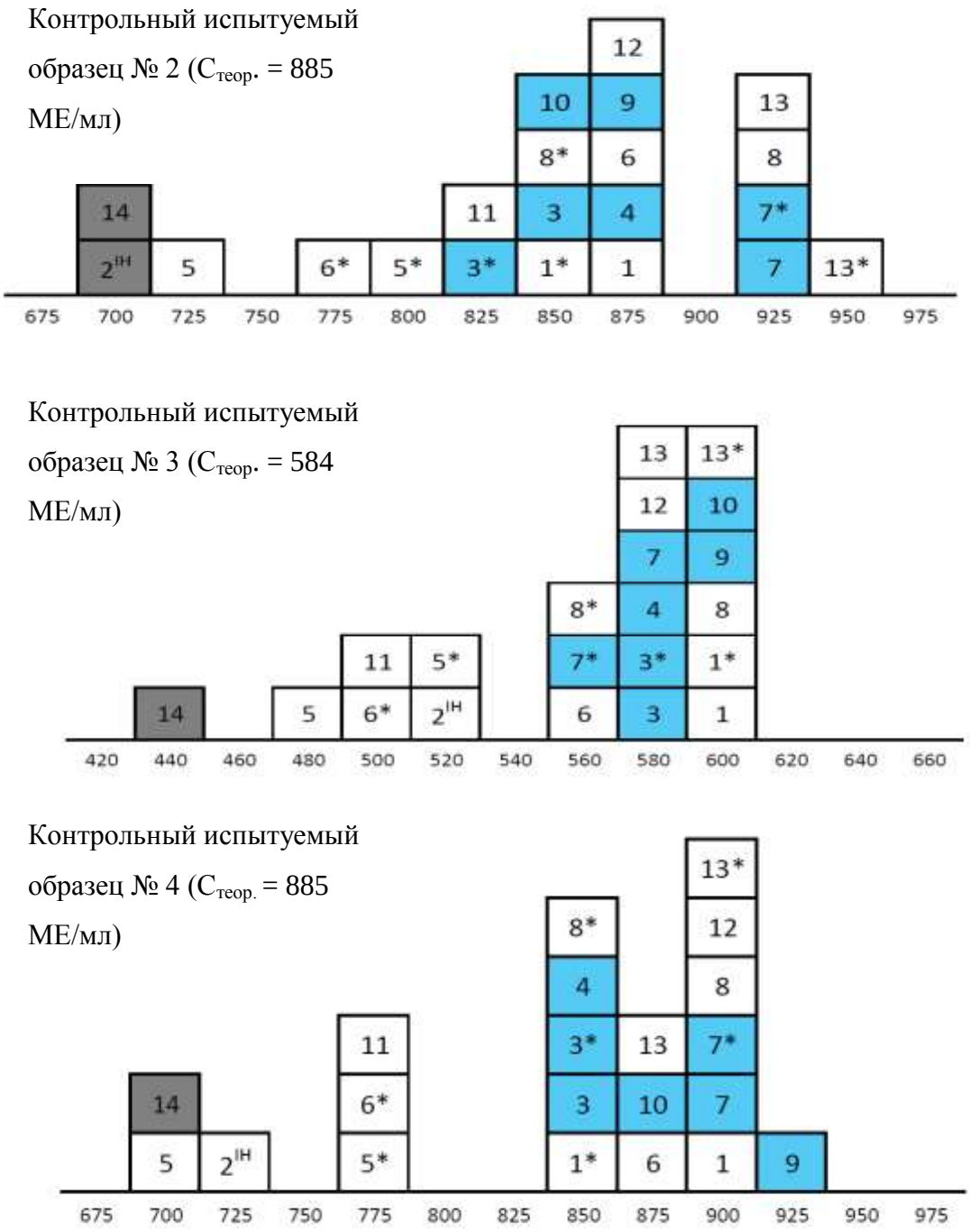


Рисунок 12. Результаты количественного определения анти-D антител.

$C_{теор.}$ - значения содержания анти-D антител в контрольных испытуемых образцах по данным EDQM.

По оси абцисс – содержание анти-D антител, МЕ/мл. По оси ординат – код лаборатории–участника в международных межлабораторных испытаний: код лаборатории ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России - 9

В результате исследований, направленных на совершенствование методики иммуноферментного анализа количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D), были получены данные, позволившие оформить заявку на патент Российской Федерации на изобретение № 2021137704 от 20.12.2021 «Способ количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D)» и получить патент на изобретение № 2777845 от 11.08.2022 (Приложение Б).

3.6 Разработка фармакопейного стандартного образца усовершенствованной методики иммуноферментного анализа количественного определения анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D)

Для стандартизации усовершенствованной методики ИФА количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) требовалось разработать ФСО биологического происхождения ГФ РФ «Стандартный образец для определения активности иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) (содержания анти-D Ат)» [9].

В качестве материала кандидата в ФСО были использованы образцы лекарственного препарата ИГЧ антирезус Rh_o(D) «Иммуноглобулин человека антирезус Rh_o(D), раствор для внутримышечного введения доза 1 мл (ампула), титр антител 1:1000, 1:2000», серии 011221, дата выпуска: 27.01.2021, срок годности до 01.01.2024, изготовленные в «Областное бюджетное учреждение здравоохранения «Ивановская областная станция переливания крови», Россия.

В соответствии с разработанной нами программой установления аттестуемой характеристики ФСО проводили оценку содержания анти-D Ат в кандидате в ФСО двумя методиками: усовершенствованной ИФА и гемагглютинации в геле. Два аналитика проводили по 12 испытаний каждым методом на разных образцах кандидата в ФСО в разные дни. Для гарантии

правильности получаемых результатов использовали 3-й МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ с аттестованным значением активности 297 МЕ/мл [46].

Усовершенствованной методикой ИФА было проведено 12 испытаний на 12 образцах препарата двумя аналитиками (по 6 испытаний каждым аналитиком) в разные дни. В ходе проведенных исследований было установлено, что среднее значение активности (содержания анти-D Ат) в образцах кандидата в ФСО, определенное методикой ИФА, составило 507,5 МЕ/мл, при этом относительное стандартное отклонение (RSD) результатов, полученных двумя аналитиками в разные дни составило 5,7 %. Результаты определения активности (содержания анти-D Ат) в образцах кандидата в ФСО методикой ИФА представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Результаты определения содержания анти-D антител в образцах кандидата в фармакопейный стандартный образец методикой иммуноферментного анализа

Метод	Аналитик	Дата	$C_{изм.}$, МЕ/мл	Хср. для аналитика, МЕ/мл	SD для аналитика	Хср. для метода, МЕ/мл	SD для метода	RSD для метода, %
ИФА	1	03.12.21	522	515,5	30,2	507,5	29,1	5,7
			510					
		06.12.21	477					
			552					
		08.12.21	477					
			545					
	2	03.12.21	500	499	28,1			
			503					
		06.12.21	477					
			465,5					
		07.12.21	504					
			547					

Примечание: ИФА - иммуноферментный анализ; $C_{изм}$ - активность (содержание анти-D-Ат IgG); Хср - среднее значение; SD – стандартное отклонение; RSD – относительное стандартное отклонение.

Для аттестации ФСО методикой гемагглютинации в геле предварительно готовили разведения образцов МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ и кандидата в ФСО. Последовательность приготовления разведений представлена в таблицах №№ 14, 15.

Таблица 14 - Последовательность приготовления разведений МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ с активностью 297 МЕ/мл

№ разведения	Объём раствора МСО, мл	Разведение МСО, титры	Объём прибавляемого 0,9% раствора NaCl, мл	Конечное разведение раствора МСО, титры
1	0,1	-	0,9	1:10
2	0,1	1:10	0,9	1:100
3	**0,1**	**1:100**	**0,9**	**1:1000**
4	0,1	1:1000	1,7	1:18000
5	0,1	1:1000	1,9	1:20000
6	0,1	1:1000	2,1	1:22000
7	0,1	1:1000	2,3	1:24000
8	0,1	1:1000	2,5	1:26000
9	0,1	1:1000	2,7	1:28000
10	0,1	1:1000	2,9	1:30000
11	0,1	1:1000	3,1	1:32000

Таблица 15 - Последовательность приготовления разведений образцов кандидата в фармакопейный стандартный образец

№ разведения	Объём раствора кандидата в ФСО, мл	Концентрация раствора кандидата в ФСО, титры	Объем прибавляемого 0,9% раствора NaCl, мл	Конечная концентрация раствора кандидата в ФСО, титры
1	0,1	-	0,9	1:10
2	0,1	1:10	0,9	1:100
3	**0,1**	**1:100**	**0,9**	**1:1000**
4	0,1	1:1000	3,4	1:35000
5	0,1	1:1000	3,9	1:40000
6	0,1	1:1000	4,4	1:45000
7	0,1	1:1000	4,9	1:50000
8	0,1	1:1000	5,4	1:55000
9	0,1	1:1000	5,9	1:60000
10	0,1	1:1000	6,4	1:65000
11	0,1	1:1000	6,9	1:70000

Методикой гемагглютинации в геле проведено 12 испытаний двумя аналитиками на 12 образцах препарата (по 6 испытаний каждым аналитиком) в разные дни. Для гарантии достоверности получаемых результатов в качестве контрольного образца использовали стандартный образец иммуноглобулина нормального с содержанием анти-D Ат, определяемых в реакции агглютинации в разведении 1:8 (Immunoglobulin (anti-D antidodies test) BRP batch 1:8, EDQM, code Y0000540).

Титр анти-D Ат определяли как максимальное разведение образца, при котором происходила агглютинация эритроцитов любой степени интенсивности. Результаты определения титра контрольного образца при каждом определении был равен 1:8, что соответствовало аттестованному значению.

Полученные титры МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ и кандидата в ФСО использовали для расчета активности (содержания анти-D антител) в МЕ/мл по формуле (7):

$$A_{фсо.}=\frac{АмсохТфсо.}{Тмсо} \text{ x } 0,2, \qquad (7)$$

где:

$A_{фсо}$ - содержание анти-D антител в испытуемом образце, МЕ/мл;

$A_{мсо}$ - содержание анти-D антител в МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ, МЕ/мл;

$T_{фсо}$ - величина, обратная максимальному разведению испытуемого образца, при котором наблюдают агглютинацию;

$T_{мсо}$ - величина, обратная максимальному разведению МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ, при котором наблюдают агглютинацию,

0,2 - коэффициент, применяется в случае необходимости пересчета МЕ/мл в мкг/мл.

Результаты определения активности (содержания анти-D Ат) в образцах кандидата в ФСО методикой гемагглютинации в геле представлены в таблице 16.

Таблица 16 - Результаты определения содержания анти-D антител в образцах кандидата в фармакопейный стандартный образец методом гемагглютинации в геле

Метод	Аналитик	Дата	Активность МСО с (содержание анти-D-антител IgG 297 МЕ/мл), титры	Активность кандидата в ФСО (содержание анти-D-антител IgG), титры	Активность кандидата в ФСО (содержание анти-D-антител IgG), МЕ/мл
Гемаг-глюти-нации в геле	1	29.11.21	1:26000	1:55000	628
			1:26000	1:50000	571
		30.11.21	1:28000	1:50000	530
			1:26000	1:40000	457
		01.12.21	1:26000	1:45000	514
			1:26000	1:40000	457
	2	29.11.21	1:30000	1:50000	495
			1:26000	1:40000	457
		30.11.21	1:26000	1:40000	457
			1:28000	1:50000	530
		01.12.21	1:26000	1:50000	571
			1:26000	1:55000	628
Примечание: МСО - международный стандартный образец анти-D иммуноглобулина ВОЗ; ФСО - фармакопейный стандартный образец ГФ РФ.					

В ходе исследования было получено 24 результата определения анти-D Ат в образцах кандидата в ФСО методиками ИФА и гемагглютинации в геле. Результаты представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Результаты определения содержания анти-D антител в образцах кандидата в фармакопейный стандартный образец методиками гемагглютинации в геле и иммуноферментного анализа

Метод	Оператор	Дата	Активность (содержание анти-D-антител IgG), МЕ/мл	Хср. для оператора, МЕ/мл	SD для оператора	Сред. знач.для метода, МЕ/мл	SD для метода	RSD для метода, %
Гемагглютинации в геле	1	29.11.21	628	526	66,5	524,6	64	12,2
			571					
		30.11.21	530					
			457					
		01.12.21	514					
			457					
	2	29.11.21	495	523	67,6			
			457					
		30.11.21	457					
			530					
		01.12.21	571					
			628					
ИФА	1	03.12.21	522	515,5	30,2	507,5	29,1	5,7
			510					
		06.12.21	477					
			552					
		08.12.21	477					
			545					
	2	03.12.21	500	499	28,1			
			503					
		06.12.21	477					
			465,5					
		07.12.21	504					
			547					
Среднее значение активности (содержание анти-Dантител) в кандидате в ФСО (n = 24)						516,03 МЕ/мл (103,2 мкг/мл)		
Стандартное отклонение (S) (n = 24)						49,4 МЕ/мл (9,9 мкг/мл)		
Расширенная неопределенность (U) (n = 24)						98,8 МЕ/мл (19,8 мкг/мл)		
RSD (n = 24)						9,6 %		

Примечание: ИФА - иммуноферментный анализ; Хср.- среднее значение активности (содержания анти-D-антител IgG; S - стандартное отклонение; RSD - относительное стандартное отклонение; U - расширенная неопределенность; n - количество испытаний.

В качестве аттестованного значения содержания анти-D Ат в кандидате в ФСО приняли среднее значение Xcp по результатам определения активности (содержания анти-D-антител) в МЕ/мл по n = 24 испытаниям двумя методами.

Расширенную неопределенность (U) аттестованного значения (Xcp) при доверительной вероятности 0,95 вычисляли как ±2SD от среднего значения (коэффициент охвата k=2, уровень доверия 95%) [6].

Аттестованное значение выразили в МЕ/мл (или мкг/мл) и представили как [$X_{ср.}$±U] МЕ/мл (или мкг/мл) (коэффициент охвата k=2, уровень доверия 95%).

Среднее значение активности (содержание анти-D-Ат IgG) в образцах кандидата в ФСО, полученное с применением двух методов, составило 516,03 МЕ/мл (103,2 мкг/мл). Коэффициент вариации для метода гемагглютинации в геле – 12,2%, для иммуноферментного метода – 5,7%, что демонстрировало удовлетворительную прецизионность полученных результатов [10].

Значение аттестуемой характеристики ФСО биологического происхождения ГФ РФ «Стандартный образец для определения активности иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) (содержания анти-D Ат)» составило 516,02 МЕ/мл (103,2 мкг/мл), расширенная неопределенность: ± 100 МЕ/мл (± 20 мкг/мл) (коэффициент охвата 2, уровень доверия 95%).

Таким образом, для стандартизации усовершенствованной методики ИФА впервые разработан и в 2022 году включен в реестр ФСО биологического происхождения ГФ РФ «Стандартный образец для определения активности иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) (содержания анти-D Ат)», ФСО 3.2.00452 серии 001-011221 предназначенный для двух методов: гемагглютинации в геле и иммуноферментного при оценке качества лекарственных препаратов ИГЧ антирезус Rh_o(D) в контрольно-аналитических лабораториях [12]. Применение данного ФСО в соответствии с разработанной инструкцией обеспечивает прослеживаемость и достоверность результатов, получаемых двумя методиками, и позволяет производителям отечественных лекарственных препаратов ИГЧ

антирезус Rh_o(D) установить значения содержания анти-D Ат в МЕ (или мкг), что способствует адекватному расчету дозы введения препарата в соответствии с клиническими рекомендациями и международными требованиями к его клиническому применению (Приложение В).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Снижение перинатальной заболеваемости и смертности при резус-конфликтной беременности возможно только при проведении мероприятий по своевременной профилактике во время беременности и в раннем послеродовом периоде, которая проводится с применением лекарственных препаратов ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$, предназначенных для специфической перинатальной профилактики резус-иммунизации женщин с резус-отрицательной принадлежностью крови [3].

В ходе проведенного научного анализа литературных источников и нормативно-правовых документов, в том числе требований и рекомендаций международных регуляторных органов, было установлено, что точная оценка содержания анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$, имеет очень важное значение, поскольку от нее зависит дозирование препарата в клинической практике.

В первых разработанных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ содержание анти-D Ат оценивали в титрах в реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации, что не позволяло количественно оценить содержание антирезус $Rh_o(D)$ Ат, способных нейтрализовать резус-положительные эритроциты плода [49].

Успехи в развитии иммунохимических методов исследований, молекулярно-генетических технологий, в частности создание моноклональных Ат, позволили разработать новые высокоспецифичные и информативные методы оценки содержания анти-D Ат, такие как иммуноферментный метод и метод проточной цитофлуориметрии, а также применять их для разработки МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ, что позволило проводить оценку специфической активности препаратов ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ количественно в МЕ или в мкг (1 мкг=5 МЕ) по отношению к МСО [99].

Профилактическую дозу препарата рассчитывают после подсчета количества эритроцитов плода, попавших в кровоток матери, с использованием

лабораторных методов анализа, например, модифицированным методом кислотного вымывания-окрашивания по Кляйхауэру и Бетке с учетом того, что 10 мкг (50 МЕ) антирезус $Rh_o(D)$ Ат нейтрализует 0,5 мл резус-положительных эритроцитов плода (или 1 мл цельной крови) [27].

Для обеспечения правильности и удобства расчета профилактических доз введения содержание специфических антител в современных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ может быть 125 мкг (625 МЕ), 150 мкг (750 МЕ), 250 мкг (1250 МЕ), 300 мкг (1500 МЕ) [11].

Методы непрямой гемагглютинации с использованием автоматизированных систем оценки результатов, иммуноферментного анализа и проточной цитофлуориметрии для оценки специфической активности препаратов ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ представлены в Европейской Фармакопее 11.0, в нашей стране указанные методы отсутствуют в структуре ГФ РФ и не были внедрены на отечественных производствах иммунобиологических лекарственных средств до настоящего времени [55, 30].

Специфическая активность препарата, производимого в РФ, оценивалась без использования стандартного образца непрямой пробой Кумбса в титрах, то есть в условных единицах, характеризующих наибольшее разведение препарата, при котором наблюдается агглютинация эритроцитов любой интенсивности, и составляла 1:1000 или 1:2000, что не позволяло точно определить содержание анти-D Ат в 1 мл препарата и обеспечить точный расчет дозы введения препарата в МЕ (или мкг) в соответствии с клиническими рекомендациями [4].

Сравнительный анализ современных методов количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ позволил сделать вывод о том, что методы проточной цитофлуориметрии и иммуноферментный за счет использования моноклональных Ат и стандартизации фенотипов эритроцитов, используемых в методах в качестве реагента, обладают большей специфичностью и селективностью в сравнении с методом автоматизированной гемагглютинации [49, 55].

В то же время метод проточной цитофлуориметрии не оправдывает себя высокой стоимостью импортного оборудования и его обслуживания, расходных материалов, сложностью методик, требующих оценки прецизионности моноклонального конъюгата, ограничением в использовании эритроцитов только фенотипа R1R1, что не всегда доступно для контрольно-аналитических лабораторий [45, 56, 57].

Иммуноферментный метод обладает высокой специфичностью за счет использования стандартизированных моноклональных Ат, производительностью за счет использования многолуночных полистироловых планшетов, отсутствием зависимости от дорогостоящего импортного оборудования, что делает иммуноферментный метод наиболее приемлемых для внедрения в практику контрольно-аналитических лабораторий, а также для применения для установления аттестуемой характеристики ФСО для определения активности ИГЧ антирезус Rh_o(D) (содержание анти-D Ат) [9].

Прямой конкурентный иммуноферментный метод количественного определения анти-D Ат в препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) основан на конкурентном иммунохимическом связывании между анти-D Ат в препарате ИГЧ антирезус Rh_o(D) и биотинилированными моноклональными анти-D Ат к специфическому эпитопу D-Аг иммуносорбента – эритроцитов человека фенотипа R2R2, иммобилизированных на твердой фазе, при этом приготовление иммуносорбента проводится в условиях каждой лаборатории самостоятельно, критерии приемлемости оценки получаемых результатов отсутствуют [49].

Известно, что некоторые зарубежные исследователи в связи с затруднениями в получении эритроцитов фенотипа R2R2, связанными с их меньшей распространенностью в популяции, предпринимали попытки использования и эритроцитов фенотипа R1R1 для самостоятельного приготовления иммуносорбента. Однако особенности их распределения на твердой фазе при приготовлении иммуносорбента не были изучены, данный этап воспроизведения метода был не стандартизован [77].

В ходе экспериментальных исследований была раскрыта способность D-Аг эритроцитов фенотипа R1R1 к образованию иммунных комплексов с анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) при количественном определении иммуноферментным методом, а также установлены различия свойств эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2, проявляемых ими при мобилизации на твердой фазе, что позволило нам подобрать условия для приготовления иммуносорбента с использованием эритроцитов фенотипа R1R1 в дополнение к фенотипу R2R2 для иммуноферментного метода количественного определения анти-D Ат.

Проведенный анализ результатов, полученных при экспериментальном исследовании по изучению особенностей распределения эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 на твердой фазе с применением цифровой оптической микроскопии, компьютерной морфометрии с визуализацией, а также иммуноферментного метода, позволил определить критерии иммобилизации эритроцитов, такие как относительная площадь покрытия эритроцитами твердой фазы и коэффициент их распределения, характеризующий плотность слоя, образованного суспензией эритроцитов, проявляющих склонность к агрегации и установить их числовые значения (для эритроцитов фенотипа R1R1 – относительная площадь распределения ($S_{отн.}$) не менее 88 %, коэффициент распределения ($К_{расп.}$) не более 0,22; для эритроцитов фенотипа R2R2 - $S_{отн.}$ не менее 70%, $К_{расп.}$ не более 0,23), соответствие которым обеспечивает качество приготовления иммуносорбента и позволяет использовать фенотип эритроцитов R1R1 в дополнение к эритроцитам фенотипа R2R2 в подобранных условиях.

Разработанный оригинальный подход к оценке качества приготовления иммуносорбента в лабораторных условиях на первом этапе воспроизведения методики ИФА повышает прецизионность получаемых результатов, а также сокращает расход дорогостоящих реагентов и трудозатрат на следующих этапах воспроизведения методики в случае, если распределение эритроцитов в результате приготовления иммуносорбента не соответствует критериям иммобилизации [51].

При проведении валидационных внутрилабораторных и межлабораторных международных исследований усовершенствованной методики ИФА были определены критерии приемлемости оценки получаемых результатов, обеспечивающие достоверность и надежность количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ при контроле качества препаратов на этапах жизненного цикла препаратов от стадий разработки и производства до введения в гражданский оборот [52].

Анализ данных научной литературы свидетельствует о том, что нормативная документация по производству и оценке качества всех зарубежных лекарственных препаратов ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$, зарегистрированных и разрешенных к медицинскому применению на территории РФ, предусматривает проведение испытаний по показателю «Специфическая активность» с использованием МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ, стандартного образца ЕФ анти-D иммуноглобулина, аттестованного относительно МСО, или стандартным образцам фирмы, калиброванных по отношению к указанным стандартным образцам. В то время как в нормативных документах отечественных производителей лекарственных препаратов ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ такие требования отсутствуют, что послужило научным обоснованием для разработки национального ФСО для определения активности ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ [11].

Известно, что использование стандартного образца является необходимым условием, позволяющим выполнять задачи метрологического обеспечения методик оценки качества иммунобиологических лекарственных препаратов, в том числе лекарственных препаратов ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$, и оценивать сопоставимость полученных результатов.

При этом разработка стандартных образцов должна включать применение нескольких надежных и валидированных методик для установления аттестуемой характеристики образца, обеспечивающих необходимую точность и прослеживаемость измерений [7, 9].

Поскольку процесс производства отечественного препарата ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ включает оценку специфической активности концентрата анти-D Ат,

полученного из сывороток иммунных доноров путем выделения фракции IgG по методу Кона методом гемагглютинации (непрямой пробой Кумбса) в титрах, то для перехода от оценки в титрах на количественную оценку в МЕ (или мкг) необходимо было также определить содержание анти-D-Ат IgG в кандидате в ФСО методом гемагглютинации в геле в сравнении с МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ.

Метод гемагглютинации в геле является более стандартизированным и специфичным в сравнении с непрямой пробой Кумбса за счет применения гелевых карт с моноклональными Ат, которые обеспечивают большую прецизионность и достоверность результатов определения анти-D Ат, что и позволило включить данный метод в программу аттестации кандидата в ФСО для определения активности ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ [5].

В программу аттестации кандидата в ФСО для определения активности ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ (содержание анти-D Ат) в качестве референтного была выбрана усовершенствованная методика ИФА количественного определения анти-D Ат в МЕ (или мкг) с использованием эритроцитов фенотипов R1R1 или R2R2 для приготовления иммуносорбента и стандартизированный применением МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ с аттестованным значением активности 297 МЕ/мл.

В ходе проведенных исследований было установлено, что среднее значение содержания анти-D Ат в образцах кандидата в ФСО, определенное ИФА, составило 507,5 МЕ/мл, при этом относительное стандартное отклонение (RSD) результатов, полученных двумя аналитиками в разные дни составило 5,7 %, что соответствовало установленным критериям приемлемости результатов, получаемых данным методом (не более 20 %).

Для определения анти-D Ат в образцах кандидата в ФСО методикой гемагглютинации в геле предварительно определяли титр 3-го МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ с аттестованным значением активности 297 МЕ/мл. Среднее значение величины, обратной разведению МСО, при котором наблюдалась агглютинация, составило 26666, при этом относительное

стандартное отклонение (RSD) 12 результатов определения составило 4,9 %, что демонстрировало удовлетворительную внутрилабораторную прецизионность.

Для гарантии достоверности результатов, получаемых методом гемагглютинации в геле, в качестве контрольного образца использовали стандартный образец иммуноглобулина нормального с содержанием анти-D Ат, определяемых в реакции агглютинации в разведении 1:8. Результаты определения титра контрольного образца при каждом определении был равен 1:8 (n=12), что соответствовало аттестованному значению.

Далее методом гемагглютинации при параллельном воспроизведении определяли титры в образцах МСО и кандидата в ФСО и рассчитывали количественное содержание анти-D Ат в ФСО в МЕ/мл относительно МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ. Среднее значение содержания анти-D-Ат IgG в кандидате в ФСО составило 524,6 МЕ/мл, при этом относительное стандартное отклонение (RSD) 12 результатов определения составило 12,2 %.

Результаты, полученные иммуноферментным методом и методом гемагглютинации в геле в сравнении с МСО анти-D иммуноглобулина ВОЗ, демонстрировали их воспроизводимость, достоверность и сопоставимость, таким образом установленное в ходе проведенных исследований аттестованное значение содержания анти-D Ат в ФСО - 516 МЕ/мл (103 мкг/мл) с расширенной неопределенностью: ± 100 МЕ/мл (± 20 мкг/мл) (коэффициент охвата 2, уровень доверия 95 %), обеспечивает прослеживаемость и точность результатов количественного определения активности в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D).

Срок годности образцов ФСО 3.2.00452 установлен в соответствии со сроком годности лекарственного препарата - кандидата в ФСО (до 01.01.2024).

Оценка стабильности проведена на производственной площадке, что подтверждается нормативной документацией производителя и материалами регистрационного досье на препарат.

Таким образом, для стандартизации усовершенствованного иммуноферментного метода был разработан ФСО «Стандартный образец для

определения активности иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$ (содержание анти-D Ат)», в том числе предназначенный для количественного определения анти-D Ат методом гемагглютинации в геле.

Разработанный ФСО «Стандартный образец для определения активности иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$ (содержание анти-D Ат)» включен в реестр ФСО биологического происхождения ГФ РФ: ФСО № 3.2.00452, и внедрен в нормативную документацию на отечественный лекарственный препарат ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$, что позволяет производителям установить норму содержания анти-D Ат в препарате в МЕ (или мкг) и обеспечивает расчет дозы введения в соответствии с международными требованиями к прогнозированию безопасности и эффективности его клинического применения для своевременной профилактики резус-конфликта во время беременности и в раннем послеродовом периоде [12].

Разработанная программа количественной оценки содержания анти-D Ат в ФСО ГФ РФ с помощью усовершенствованной методики ИФА и методики гемагглютинации в геле позволяет проводить аттестацию последующих серий кандидата в ФСО и обеспечивает стандартизацию количественного определения анти-D Ат в ЛП ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$.

Проведенные исследования показали, что методика ИФА, усовершенствованная способом приготовления иммуносорбента с применением эритроцитов человека фенотипов R1R1 или R2R2 и оценкой качества его приготовления, а также стандартизированная применением ФСО, обеспечивает точность и достоверность количественного определения анти-D Ат в ЛП ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$.

Эффективно и результативно, с получением принципиально новых результатов использован комплекс методов исследований, в том числе иммунологические методы иммуноферментного анализа, гемагглютинации в геле, а также цифровая оптическая микроскопия и компьютерная морфометрия с визуализацией для модернизации методики ИФА количественного определения анти-D Ат, которая обеспечила точную количественную оценку основного действующего вещества в лекарственных препаратх ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$.

Полученные данные продемонстрировали, что применение усовершенствованной методики ИФА для установления аттестуемой характеристики ФСО в МЕ (или мкг) для определения активности ИГЧ антирезус Rh_o(D) обеспечивает стандартизацию количественного определения анти-D-Ат IgG в ЛП ИГЧ антирезус Rh_o(D).

Экспериментально доказано, что национальный ФСО для определения активности ИГЧ антирезус Rh_o(D), разработанный с применением усовершенствованной методики ИФА для количественного определения анти-D Ат, позволяет обеспечить достоверность и прослеживаемость результатов их определения в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D).

При этом была предложена новая модель оценки качества самостоятельного приготовления иммуносорбента с использованием эритроцитов человека фенотипов R1R1 или R2R2 в лабораторных условиях при количественном определении анти-D Ат методикой ИФА с применением цифровой оптической микроскопии и компьютерной морфометрии с визуализацией.

Были определены критерии оценки приемлемости получаемых результатов количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D) усовершенствованной методикой ИФА, что позволило повысить точность измерений с расширением границ применимости метода.

В ходе проведенного исследования доказана перспективность использования в практике иммуноферментного метода, усовершенствованного способом приготовления иммуносорбента с применением эритроцитов человека фенотипов R1R1 или R2R2 и оценкой качества его приготовления, и стандартизированного применением национального стандартного образца, обеспечивающего прослеживаемость и достоверность количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D), что свидетельствует о научно-практической значимости результатов проведенных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате теоретических и экспериментальных исследований проведен научный анализ современного состояния проблемы оценки содержания анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$. Установлено, что необходимым условием получения качественных лекарственных препаратов ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ является точная количественная оценка анти-D Ат, которая должна проводится валидированной методикой в сравнении со стандартным образцом.

Показано, что доступной альтернативой для количественной оценки содержания анти-D Ат в отечественных лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$, а также для применения при установлении аттестуемой характеристики национального стандартного образца для количественного определения анти-D Ат в препаратах является иммуноферментный метод.

Обоснована необходимость усовершенствования иммуноферментного метода, заключающееся в подборе условий приготовления иммуносорбента для возможности применения эритроцитов более распространённого в российской популяции фенотипа эритроцитов R1R1 в дополнение к фенотипу R2R2 для иммобилизации на твердой фазе, разработке критериев иммобилизации эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 для оценки корректности этапа приготовления иммуносорбента, разработке критериев приемлемости оценки получаемых результатов при валидации усовершенствованной методики ИФА с применением указанных фенотипов, а также в применении разработанного национального ФСО для определения активности ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ (содержания анти-D Ат) для усовершенствованной методики.

В ходе экспериментального исследования по изучению особенностей распределения эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 на твердой фазе были подобраны условия для приготовления иммуносорбента, разработаны критерии иммобилизации эритроцитов: относительная площадь ($S_{отн.,}$ %) покрытия

эритроцитами и коэффициент их распределения ($К_{расп.}$), характеризующий плотность слоя, образованного агрегированными эритроцитами, а также установлены числовые значения критериев иммобилизации, соответствие которым позволяет использовать фенотип эритроцитов R1R1 в дополнение к эритроцитам фенотипа R2R2 в подобранных условиях, а также оценивать корректность самостоятельного приготовления иммуносорбента при количественном определении анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D). Таким образом, для эритроцитов фенотипа R1R1 $S_{отн.}$ должна быть не менее 88 %, $К_{расп.}$ должен быть не более 0,22; для эритроцитов фенотипа R2R2: $S_{отн.}$ – не менее 70%, $К_{расп.}$ – не более 0,23.

При проведении валидационного исследования по подтверждению пригодности усовершенствованной методики ИФА с применением эритроцитов фенотипов R1R1 и R2R2 для приготовления иммуносорбента по характеристикам: правильность, промежуточная прецизионность (повторяемость и внутрилабораторная воспроизводимость), линейность аналитического диапазона, селективность, специфичность, устойчивость методики и сопоставимость результатов при использовании эритроцитов двух фенотипов были определены критерии приемлемости оценки получаемых результатов количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D), позволяющие гарантировать их достоверность.

Подтверждены точность и прецизионность количественного определения анти-D Ат в образцах с неизвестным содержанием определяемого вещества при проведении международного межлабораторного исследования подтверждения квалификации усовершенствованного иммуноферментного метода.

Впервые разработан и включен в реестр ФСО биологического происхождения национальный ФСО «Стандартный образец для определения активности иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) (содержания анти-D-антител IgG)», ФСО 3.2.00452 усовершенствованной методики ИФА количественного определения анти-D Ат в леекарственных препаратах ИГЧ антирезус Rh_o(D), применение которого позволяет производителям отечественных

лекарственных препаратов ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ установить значения содержания анти-D Ат в МЕ (или мкг), что способствует адекватному расчету дозы введения препарата в соответствии с клиническими рекомендациями.

Проведенные диссертационные исследования послужили научным обоснованием для разработки проекта ОФС ГФ РФ «Определение антирезус $Rh_o(D)$ антител иммуноглобулина G в препаратах иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$» с целью введения в структуру ГФ РФ (Приложение Г).

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ иммобилизации эритроцитов фенотипов R1R1 или R2R2 для приготовления иммуносорбента, позволившие расширить возможности применения метода ИФА для количественной оценки содержания анти-D Ат в ЛП ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$. Разработаны критерии иммобилизации эритроцитов на твердой фазе с сорбционной емкостью 650 нг белка/см^2 для оценки качества приготовленного иммуносорбента: для фенотипа R1R1 – относительная площадь распределения ($S_{отн.}$) должна быть не менее 88 %, коэффициент распределения ($К_{расп.}$) должен быть не более 0,22; для эритроцитов фенотипа R2R2 $S_{отн.}$ должна быть не менее 70 %, $К_{расп.}$ должен быть не более 0,23.

2. При валидации усовершенствованной методики количественного определения анти-D Ат в лекарственных препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ с помощью иммуносорбента, приготовленного с использованием эритроцитов фенотипов R1R1 или R2R2, установлены критерии оценки приемлемости получаемых результатов: 1) относительные значения содержания анти-D Ат в испытуемом образце должны быть в интервале (±20%) от установленного (номинального) значения; 2) коэффициент детерминации (R^2) при построении калибровочного графика должен быть не менее 0,9; 3) относительное стандартное отклонение (RSD, %) трех значений оптической плотности для каждой концентрации не должен превышать 20%.

3. Разработан ФСО биологического происхождения «Стандартный образец для определения активности иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$ (содержание анти-D Ат)», ФСО 3.2.00452 со значением активности 516 МЕ/мл (103 мкг/мл), расширенной неопределенностью: ±100 МЕ/мл (±20 мкг/мл) (коэффициент охвата 2, уровень доверия 95%), предназначенный для двух методик: усовершенствованной ИФА и гемагглютинации в геле, который позволяет производителям отечественного ЛП ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ установить значения содержания анти-D Ат в препарате в МЕ (или мкг), что будет

способствовать расчету дозы введения в соответствии с клиническими рекомендациями Минздрава Российской Федерации от 2020 года «Резус-иммунизация Гемолитическая болезнь плода», КР596.

4. Разработана программа установления аттестуемой количественной характеристики содержания анти-D Ат в МЕ (или мкг) в ФСО 3.2.00452 ГФ РФ с помощью усовершенствованной методики ИФА и методики гемагглютинации в геле, которая позволяет проводить аттестацию последующих серий кандидата в ФСО также в МЕ (или мкг) и обеспечивает стандартизацию количественного определения анти-D Ат в ЛП ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$ на этапах производства препаратов, их государственной регистрации и при введении в гражданский оборот.

5. Усовершенствованная методика ИФА включена в проект ОФС «Определение антирезус $Rh_o(D)$ антител в препаратах ИГЧ антирезус $Rh_o(D)$» для последующего введения в ГФ РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авруцкая В.В., Гимбут В.С., Хлопонина А.В. Современные принципы ведения резус-конфликтной беременности // Проблемы женского здоровья. - 2015. - Т. 10.- № 4. - С. 48 - 56.
2. Анастасиев В.В. Развитие технологических приемов промышленного получения внутривенных иммуноглобулинов // Новое в трансфузиологии. - 1997.- № 20. - С. 89-95.
3. Антонов А.Г., Дегтярев Д.Н., Нароган М.В., Карпова А.Л., Сенькевич О.А., Сафаров А.А., Сон Е.Д., Малютина Л.В. Гемолитическая болезнь новорожденных. В кн.: Неонатология. Клинические рекомендации / под ред. Н.Н. Володина.: М. ГЭОТАР-Медиа, 2019. – С. 19-35.
4. Вильданова Н.С., Коромщикова Е.С., Калинина Е.Н., Воробьев К.А., Парамонов И.В., Кудашева Э.Ю. Этапы стандартизации препаратов антирезусного иммуноглобулина человека по показателю "Специфическая активность" // Биопрепараты. Профилактика, Диагностика, Лечение - 2022. - Т.22.- № 3. - С. 241-248. DOI: https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-241-248.
5. Волкова О.Я. Гелевая технология - новое направление в иммуногематологии // Клинико-лабораторная диагностика. - 2007.- №2. - С. 34-37.
6. Волкова Р.А., Фадейкина О.В. Проблемы оценки неопределенности методик испытаний и стандартных образцов иммунобиологических лекарственных средств // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2017. - Т.17, № 61. - С. 27-31.
7. Волкова Р.А., Фадейкина О.В., Климов В.И., Саканян Е.И., Олефир Ю.В., Меркулов В.А. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере

обращения биологических лекарственных средств // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2016. - Т.16.- № 4. С. 229-236.

8. Гланц С.А. Медико-биологическая статистика. - М.: Практика; 1999. 459 с.
9. ГОСТ Р 8.753-2011. Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы материалов (веществ). Основные положения. Доступ из справочно-правовой системы «Консультант Плюс» (дата обращения: 07.02.2023).
10. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения. Доступ из справочно-правовой системы «Консультант Плюс» (дата обращения: 07.02.2023).
11. Государственный реестр лекарственных средств Министерства здравоохранения Российской Федерации [Электронный ресурс]. URL: http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx (дата обращения: 07.02.2023).
12. Государственный Реестр фармакопейных стандартных образцов биологического происхождения государственной фармакопеи Российской Федерации [Электронный ресурс] URL: https://www.regmed.ru/content/page/Registry-SPhRS_lemma-biol) (дата обращения: 07.02.2023).
13. Донсков С.И. Группы крови системы Rhesus. Теория и практика. - М.: ВИНИТ и РАН; 2005. 392 с.
14. Донсков С.И. Группы крови человека: Руководство по иммуносерологии. - М.: ИП Скороходов В.А.; 2011. 1016 с.
15. Донсков С.И. Экспрессия антигена D. В кн.: Донсков С.И. Группы крови человека: Руководство по иммуносерологии. М.: ИП Скороходов В.А.; 2011. 1016 с.
16. Дубинкин И.В., Донсков С.И., Пискунова Т.М. Серологическая характеристика моноклональных антител к антигенам Rh-Hr, Kell //

Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины: материалы конференции. Киров, 2005; С. 156-157.

17. Жибурт Е.Б. Иммунологические основы переливания крови. В кн.: Трансфузиология: учебник. СПб.: Питер; 2002. 736 с.

18. Жибурт Е.Б. Пути повышения качества препаратов крови // Ремедиум. - 2005. - № 4. - С.42-44.

19. Иванская Н.В., Кислых Е.Н., Максименок Е.В., Раевская Г.Е., Пилипенко В.Г. Практическое пособие по иммуноферментному анализу. [Электронный ресурс]. URL: http://diaproph.com.ua/pdf/metodichky/rus/1_rus_imunoferment_analiz.pdf.

20. Искакова О.А. Применение гелевой технологии для иммуногематологических исследований крови. // Наука и здравоохранение. - 2013. - № 1. С. 47-49.

21. Климов В.И., Саканян Е.И., Волкова Р.А., Фадейкина О.В., Мовсесянц А.А., Лебединская Е.В., Шестакова А.П. Анализ потребностей в стандартных образцах, предназначенных для оценки качества биологических лекарственных средств // Биопрепараты. Профилактика, Диагностика, Лечение. 2017. - Т. 17. - № 2. - С. 87-94.

22. Коноплянников А.Г., Павлова Н.Г. Изосерологическая несовместимость крови матери и плода. Гемолитическая болезнь плода и новорожденных. В кн.: Акушерство. Национальное руководство. 2015: с. 324-334.

23. Кудашева Э.Ю. Совершенствование методических основ стандартизации и медицинского применения иммунобиологических лекарственных препаратов, полученных из плазмы крови человека: дис. д-ра мед. наук. М.; 2020.

24. Макогон А.А., Андрюшина И.В. Гемолитическая болезнь плода: мониторинг, лечение плода и родоразрешение // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. - 2018. - Т.17. - № 3. - С. 45-52.

25. Макогон А.В. Комплексная пренатальная диагностика и лечение гемолитической болезни плода: возможности и перспективы // Российский Вестник перинатологии и педиатрии. - 2002. - № 6. - С. 11-13.

26. Манылова Н.А., Логвинова И.И., Крутских Е.Л., Карамова Л.Н., Гудкова А.Н. Исследование крови родильниц на фетальные эритроциты для диагностики фето-материнских трансфузии. Материалы 2 научно-практической конференции, посвященной 120-летию родильного дома № 10. Воронеж. - 2008. - С. 42-47.

27. Манылова Н.А., Логинова И.И. Использование теста Клейхауэра-Бетке для выявления фето-материнской трансфузии и определение факторов риска развития анемии у новорожденных первой недели жизни // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. - 2008. - Т. 7. - № 1. - С. 142-144.

28. Меркулов В.А., Саканян Е.И., Волкова Р.А., Климов В.И., Шемерянкина Т.Б., Яшкир В.А. Фармакопейные стандартные образцы и практика их применения в отечественной системе стандартизации лекарственных средств // Химико-фармацевтический журнал. - 2016. - Т.50. - №. 4. - С. 40-43. DOI: https://doi.org/10.30906/0023-1134-2016-50-4-40-43.

29. Миронов А.Н., Сакаева И.В., Саканян Е.И. Стандартные образцы в практике зарубежного и отечественного фармацевтического анализа. // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. - 2012. - № 3. - С. 56-60.

30. Научное обоснование и разработка методологии экспертизы качества, эффективности и безопасности препаратов крови: отчет о НИР (заключ.) / ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России; рук. Бондарев В.П., Борисевич И.В.; исполн.: Иванов В.Б., Кудашева Э.Ю. [и др.] М., 2017. - 1260с. - Библиогр.: с.434 -473. № ГР 115111740010. Деп. в ЦИТИС 18.01.2018. № ИКРБС АААА-Б18-218011890074-9.

31. Неонатология: национальное руководство / под ред. Н.Н. Володина. М.: ГЭОТАРМедиа; 2009. 848 с.

32. О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств»: Федеральный закон №429-ФЗ от 22.12.2014 [Электронный ресурс]. URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_172505/ (дата обращения 07.02.2023).

33. Оловникова Н.И., Николаева Т.Л., Эршлер М.А. Иммунопрофилактика резус-иммунизации: перспектива создания моноклонального иммуноглобулина для предупреждения гемолитической болезни новорожденных // Иммунология. - 2018. -Т. 39. - № 1. - С. 74-80. DOI: http://doi.org/10.18821/0506-4952-2018-39-1-74-80.

34. Оптическая микроскопия: ОФС.1.2.1.0009.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. [Электронный ресурс]. URL: https://femb.ru/record/pharmacopea14 (дата обращения 07.02.2023).

35. Патент на изобретение № 2777845 от 11.08.2022, Российская Федерация, МПК: A61K35/12,15; G01N33/53 Способ количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) / Шведова Е.В., Кудашева Э.Ю., Лешина С.А., Давыдов Д.С.; заявитель и патентообладатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, заявка № 2021137704 от 20.12.2021.

36. Поляк Р., Кату Р., Каруш Ф. Иммуноглобулины. М.: Мир, 1981. 495 с.

37. Руководства ICH для фармацевтической отрасли. Качество. / под ред. В.В. Береговых. Санкт-Петербург: Профессия; 2017.

38. Руководство по применению аналитической программы Image-ProPremier Media Cybernetics (Media Cybernetics, США) [Электронный ресурс]. URL: https://www.mediacy.com/imagepro (дата обращения 07.02.2023).

39. Савельева Г.М., Курцер М.А., Панина О.Б., Сичинава Л.Г., Клименко П.А., Коноплянников А.Г., Алексеенкова М.В. Диагностика, лечение,

профилактика гемолитической болезни плода при резус-сенсибилизации // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2006. - № 6. - С. 73–78.

40. Свидетельство № 2006612065 об официальной регистрации программы для ЭВМ «Паралайн» / Петухов В.Г.
41. Совершенствование системы разработки и применения стандартных образцов, предназначенных для оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств: отчет о НИР (заключ.) / ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России; рук. Саканян Е. И., Климов В. И., Волкова Р. А.; исполн.: Яшкир В. А., Фадейкина О. В. [и др.]. М., 2017. 297 с. Библиогр.: с. 142–158. № ГР 115111740007. Деп. в ЦИТИС 12.02.2018. № ИКРБС АААА-Б18-218021290179-6. 13.
42. Супотницкий М.В., Миронов А.Н., Елапов А.А. Стандартные образцы иммунобиологических лекарственных препаратов как объекты интеллектуальной собственности // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. - 2013. - № 3. - С. 36-39.
43. Суханова Л.П. Перинатальные проблемы воспроизводства населения России в переходный период. М: Реабилитация, Канон+; 2006.
44. Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу биологических образцов. Приложение № 6 Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Утверждены Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85.
45. Трусов Г.А., Чапленко А.А., Семенова И.С. Применение проточной цитометрии для оценки качества биомедицинских клеточных продуктов // Биопрепараты. 2018. - Т. 18. - № 1. - С. 16-24. DOI: https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-1-16-24.
46. Фадейкина О.В., Волкова Р.А. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств // Химико-

фармацевтический журнал. 2017.- Т. 51. - № 8. - С. 44-50. DOI: https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-8-44-50.

47. Федеральный закон N 61–ФЗ от 12 апреля 2010 г. «Об обращении лекарственных средств». [Электронный ресурс]. URL: http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.gi?req (дата обращения 07.02.2023).

48. Фримель Х. Иммунологические методы. М.: Мир; 1979. 518 с.

49. Шведова Е.В., Кудашева Э.Ю., Климов В.И. Методы оценки специфической активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D): современное состояние проблемы // Иммунология. 2020. - Т. 41. № 3. - С. 256–261. DOI: http://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-3-256-261.

50. Шведова Е.В., Кудашева Э.Ю., Мовсесянц А.А. Совершенствование подхода к оценке содержания анти-D-антител в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rho(D) // Сборник тезисов. М.: У Никитских ворот. – С.136. EDN: WAYMXP.

51. Шведова Е.В., Лешина С.А., Давыдов Д.С., Борисевич И.В., Кудашева Э.Ю. Разработка критериев иммобилизации эритроцитов человека фенотипов R1R1 и R2R2 на твердой фазе при определении содержания анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) методом иммуноферментного анализа // Иммунология. - 2022. Т. 43. - № 2. - С. 208-216. DOI: https://doi.org/10.33029/0206-4952-2022-43-2-208-216.

52. Шведова Е.В., Лешина С.А., Кудашева Э.Ю., Борисевич И.В., Меркулов В.А., Шведов Д.В. Разработка критериев приемлемости оценки результатов количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) иммуноферментным методом // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2022. - Т. 22. - № 3. - С. 288-300. DOI: https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-266-278.

53. Ahaded A., Debbia M., Beolet P. Evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay of IgG anti-D and IgG subclass concentrations in immunoglobulin

preparations // Transfusion. - 1999. V. 39. P. 515-521. DOI: https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1999.39050515.x.

54. American Academy of Pediatrics and the American College of Obstetricians and Gynecologists. Guidelines for perinatal care. 8th ed. Elk Grove Village, IL; Washington, DC; 2017.

55. Assay of Human Anti-D Immunoglobulin 01/2008:20713 / European Pharmacopoeia, 11th ed. Strasboung : Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe.

56. Austin E.B., McIntosh Y., Anti-D quantitation by flow cytometry: a comparison of five methods // Transfusion. - 2000. - V. 40. - N 1. P. 77-83 DOI: https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2000.40010077.x.

57. Austin E.B., McIntosh Y., Hodson C. Anti-D quantitation by flow cytometry: an alternative to the Autoanalyzer? // Transfus Med. - 1995. - V. 5. - P. 203–210. DOI: 10.1111/j.1365-3148.1995.tb00229.x.

58. Bangham D.R., Kirkwood T.B., Wydrow G., Inernational collaborative study of assay of anti-D (anti-Rh) immunoglobulin // Br.J. Haematol. - 1978. V. 38. - N. 3. - P. 407-423. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1978.tb01061.x.

59. Bioanalytical method validation guidance for industry. U.S. Biopharmaceutics, May 2018. [Электронный ресурс]. URL: http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm (дата обращения 07.02.2023).

60. Bowman J.M. The prevention of Rh immunization // Transfusion. 1988. - V. 2. - N. 3. P. 129-150. DOI: http://doi.org/10.1016/s0887-7963(88)70039-5.

61. Bowman J.M. Thirty-five years of Rh prophylaxis // Transfusion. 2003. - V. 43. - N. 12. P. 1661-1666 DOI: http://doi.org/10.1111/j.0041-1132.2003.00632.x.

62. Chilcott J., Tappenden P., Lloyd Jones M., Wight J., Forman K., Wray J., Beverley C. The economics of routine antenatal anti-D prophylaxis for pregnant

women who are rhesus negative // BJOG. 2004. - V. 111. - N. 9. - P. 903-907. DOI: http://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2004.00226.x.

63. Contreras M. The prevention of Rh haemolytic disease of the fetus and newborn-general background // Br. J. Obstet. Gynaecol. 1998. - V. 105. - P. 7-10.

64. Delaney M., Matthews D.C. Hemolytic disease of the fetus and newborn: managing the mother, fetus, and newborn // Hematol Am Soc Hematol Educ Progr. 2015. - P. 146-151. DOI: http://doi.org/10.1182/asheducation-2015.1.146.

65. Dmitriev D.A., Massino Yu.S., Segal O.L. Kinetic analysis of interactions between bispecific monoclonal antibodies and immobilized antigens using a resonant mirror biosensor // Journal of Immunological Methods. 2003. - N 280. - P. 183-199. DOI: https://doi.org/10.1016/s0022-1759(03)00271-0.

66. EDQM FORM/171-Rev.05 [18/12/2017] Attestation of participation in Proficiency Testing Scheme study on Human anti-D immunoglobulin assay (PTS223)/ Report PA/PH/PTS(22)7 DEF. Strasbourg. 29.04.2022.

67. EDQM Immunoglobulin panel for anti-D antibodies test BRP. Instructions for use [Электронный ресурс]. URL: https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/db/4DCGI/leaflet?leaflet=Y0000540_1.pdf.

68. EDQM Proficiency Testing Scheme. PTS223: Human anti-D immunoglobulin assay. [Электронный ресурс]. URL: https://www.edqm.eu/en/physico-chemical-and-biological-pts (дата обращения: 07.02.2023)

69. EDQM. Department of biological standardisation, OMCL Network and healthcare (DBO). Protocol PTS223: Human anti-D immunoglobulin assay. PA/PH/PTS(21)17. Strasbourg. October 2021. [Электронный ресурс]. URL: https://www.edqm.eu/en/omcl-background-and-mission (дата обращения: 07.02.2023).

70. FDA. Blood & Blood Products [Электронный ресурс]. URL: http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/default.htm (дата обращения: 07.02.2023).

71. Givol D., Reisfeld R.A., Mandy W.J. Structural analysis of antibody combining site. In: Contemporary Topics in Molecular Immunology, vol. 2. Plenum Press, New York. 1973. P. 27-50.

72. Guidance on validation of bioanalytical methods (draft) / Committee for medicinal products for human use [Электронный ресурс]. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-validation-bionanalytical-methods_en.pdf (дата обращения: 07.02.2023).

73. Guideline on the clinical investigation of human anti-D immunoglobulin for intravenous and/or intramuscular use: EMA/CPMP/BPWG/575/99, rev.1 [Электронный ресурс] URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003334.pdf (дата обращения: 07.02.2023).

74. Hannafin B., Lovecchio F., Blackburn P. Do Rh-nagative women with first trimester spontaneous abortions need Rh immune globulin? // Emergency Medicine Journal. 2006/ - N 24. - P. 487-90. DOI: http://doi.org/10.1016/j.ajem.2006.01.020.

75. Herbert W.J. Passive hemagglutination. Handbook of Experimental Immunology, ed. By Weir D.M. Blackwell Scientific Publications, Oxford – Edinburgh, 1967.

76. Human anti-D immunoglobulin 01/2015:0557 // European Pharmacopoeia 11.0 [Электронный ресурс]. URL: http://online6.edqm.eu/ep110/ (дата обращения: 07.02.2023).

77. International collaborative study to calibrate proposed 3rd WHO International standard for anti-D Immunoglobulin. WHO Expert committee on biological standardization. WHO/BS/2018.2332. [Электронный ресурс]. URL: https://www.who.int/biologicals/BS.2018.2332_3rd_IS_ANTI-D.pdf. (дата обращения: 07.02.2023).

78. Liumbruno G.M., D'Alessandro A., Rea F. The role of antenatal immunoprophylaxis in the prevention of maternal-foetal anti-Rh(D) alloimmunisation // Blood. Transfus.2010. - V. 8 - N 1. - P. 8-16.

79. Llopis F., Carbonell-Uberos F., Planelles M.D., Montero M., Plasencia I., Carillo C. A new microplate red blood cell monolayer technique for screening and identifying red blood cell antibodies // Vox Sang. 1996. N 70. P. 152–156. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1996.tb01314.x.

80. MacKenzie I.Z., Roseman F., Thompson K. The kinetics of routine antenatal prophylactic intramuscular injections of polyclonal anti-D immunoglobulin // An International journal of Obstetrics and Gynaecology. 2006. - N 113. - P. 96-98. DOI: http://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2005.00789.x.

81. McBain R.D., Crowther C.A., Middleton P. Anti-D administration in pregnancy for preventing Rhesus alloimmunisation // Cochrane database Syst Rev. 2015. N 9: CD000020. DOI: http://doi.org/10.1002/14651858.CD000020.pub3.

82. National Institute for Clinical Excellence. Guidance on the use of routine antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative women. Technology Appraisal Guidance, N 41. London: National Institute for Clinical Excellence; 2002.

83. Paul E.B. Standardization of US reference Rh_o(D) immune globulin by quantitative automated hemagglutination // J.Biol. Standardization. - 1986. - N 14 - P. 121-125. DOI: 10.1016/0092-1157(86)90030-2.

84. PLA Database version 2.0.0 (build 551), S/N: 10536.

85. Schaffner G., Kayser T., Tonjes A., Volkers P. Validation of flow cytometry to quantify the potency of anti-D immunoglobulin preparations // VoxSanguinis V. 84. P. 129-136 DOI: https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.2003.00267.x.

86. Scott M.L. The complexities of the Rh system // Vox Sanguinis. - 2004. - N 87.- P. 58-62. DOI: http://doi.org/10.1111/j.1741-6892.2004.00431.x.

87. Scott M.L., Voak D., Phillips P.K., Hoppe A.P., Kochman S.A. Review of the problems involved in using enzymes in blood group serology-provision of freeze-

dried ICSH/ISBT protease enzyme and anti-D reference standards. International Council for Standardization in Haematology. International Society of Blood Transfusion // Vox Sang 1994. - V. 679. N 1. P. 89-98. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1994.tb05051.x.

88. Sergio A. Oviedo. Flow cytometry assay for quantitation of therapeutical anti-D IgG during process control in the pharmaceutical production // Innovations in cell research and therapy. - 2019. DOI: https://doi.org/10.5772/intechopen.89614.

89. Sindhu C., Hedley Ben D., Keeney M. Common flow cytometry pitfalls in diagnostic hematopathology // Clinical Cytometry. - 2019. V. 96. - P. 449-463. DOI: http://doi.org/10.1002/cyto.b.21854.

90. Statistical Principles for Clinical Trials E9: CPMP/ICH/363/96 [Электронный ресурс]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002928.pdf (дата обращения: 07.02.2023).

91. The Expert Committee on Biological Standardization preferred this term to "blood grouping antisera", which was used by the WHO Working Group on the Standardization of Human Blood Products and Related Substances. 1968; Annex 1: p. 25.

92. Thorpe S.J., Heath A.B. Development and evaluation of a competitive radioimmunoassay using monoclonal antibodies against Rh D for determining anti-D potency of clinical grade immunoglobulin preparations // Transfus Med. - 1995. V. 5. - N 2. P. 97-103. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.1995.tb00195.x.

93. Thorpe S.J., Turner C.E., Heath A.C., Sands D. A competitive enzyme-linked immunoassay using erythrocytes fixed to microtitre plates for anti-D quantitation in immunoglobulin products // Vox Sang. - 2000. - N 79. P. 100-107. DOI: https://doi.org/10.1159/000031220.

94. Trope S.J., Fox B., Sands D. A stable lyophilized reagent for use in a potential reference assay for quantitation of anti-D in immunoglobulin products // Biologicals. - 2002. N 30. P. 315-321. DOI: https://doi.org/10.1006/biol.2002.0347.

95. Trope S.J., Fox B., Turner C. Competitive enzyme-linked immunoassay of monoclonal immunoglobulin G anti-D preparations // Transfus Med. - 2003. - V 13. - N 3. - P. 209-212. DOI: 10.1046/j.1365-3148.2003.00436.x.

96. Trope S.J., Sands D., Fox B., Behr-Gross M-E. A global standard for anti-D immunoglobulin: International collaborative study to evaluate a candidate preparation // Vox Sanguinis. - 2003. V. 85. - N 4. - P 313-321. DOI: 10.1111/j.0042-9007.2003.00367.x.

97. Trope S.J., Sands D., Rautmann G. International collaborative study to evaluate methods for quantification of anti-D in immunoglobulin preparations // Vox Sang. - 2002. N 83. - P 42-49. DOI: http://doi.org/10.1046/j.1423-0410.2002.00169.x.

98. White J., Qureshi H., Massey E., Needs M., Byrne G., Daniels G., Allard S., British Committee for Standards in Haematology. Guideline for blood grouping and red cell antibody testing in pregnancy // Transfus Med. - 2016. - V. 26. N 4. P. 246-263. DOI: http://doi.org/10.1111/tme.12299.

99. WHO International Standard Anti-D Immunoglobulin, NIBSC code: 01/572. DOI: Instructions for Use. https://nibsc.org/documents/ifu/01-572.pdf.

100. WHO International Standard Anti-D Immunoglobulin. NIBSC code: 16/332. Instructions for use [Электронный ресурс]. URL: https://www.nibsc.org/documents/ifu/16-332.pdf (дата обращения 07.02.2023).

101. WHO: 28th report. Expert Committee on Biological Standardization. WHO Technical Report Series. 1977. V. 610. P. 29-31. [Электронный ресурс] URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3144808 (дата обращения 07.02.2023).

102. Working Standard Biotinylated Brad-5. NIBSC code: 02/230. Instructions for use [Электронный ресурс]. URL: https://www.nibsc.org/documents/ifu/02-230.pdf (дата обращения 07.02.2023).

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А.
Заключение Европейского директората по качеству лекарственных средств (EDQM) от 29.04.2022…… 2

Приложение Б.
Патент на изобретение № 2777845 от 11.08.2022, Российская Федерация, МПК: A61K35/12,15; G01N33/53 «Способ количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D)» ……... 3

Приложение В.
Нормативно-техническая документация на Фармакопейный стандартный образец № 3.1.000452…… 4

Приложение Г.
Проект Общей Фармакопейной статьи «Определение антирезус Rh_o(D) антител иммуноглобулина G в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D)»…… 10

Приложение А

Заключение Европейского директората по качеству лекарственных средств (EDQM)

Council of Europe

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare

ATTESTATION OF PARTICIPATION

The EDQM, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, hereby declares that

FSBI SCEEMP OF THE MINISTRY OF HEALTH OF THE RUSSIAN FEDERATION
TC MIBP
127051 - MOSCOW - RUSSIA

has participated in the Proficiency Testing Scheme study on Human anti-D immunoglobulin assay (PTS223)
and has been assigned laboratory code no. 9

The statistical evaluation of the results is presented and discussed in the report PA/PH/PTS (22) 7 DEF

Strasbourg, 29.04.2022

Laurent Mallet, Ph.D.
Head of DBO, EDQM

FORM/171- Rév. 05 [18/12/2017]

Приложение Б

Патент на изобретение

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2777845

Способ количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh0(D)

Патентообладатель: ***Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России) (RU)***

Авторы: ***Шведова Евгения Владимировна (RU), Кудашева Эльвира Юрьевна (RU), Лешина Светлана Анатольевна (RU), Давыдов Дмитрий Сергеевич (RU)***

Заявка № **2021137704**
Приоритет изобретения **20 декабря 2021 г.**
Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **11 августа 2022 г.**
Срок действия исключительного права на изобретение истекает **20 декабря 2041 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов

Приложение В

Нормативно-техническая документация на Фармакопейный стандартный образец № 3.1.000452

научный центр экспертизы средств медицинского применения

федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)
Юридический адрес: 127051, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, тел. (495) 625-43-48, 625-43-42
Фактический адрес: 119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, стр. 1,3,
тел. (499) 190-18-18, доб.65-17, 64-57, 8(499)252-75-59

ПАСПОРТ
ФАРМАКОПЕЙНЫЙ СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ
ГОСУДАРСТВЕННОЙ ФАРМАКОПЕИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(отраслевой)

СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ
АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА АНТИРЕЗУС Rh_0(D)
(содержание анти-D-антител IgG)

ФСО 3.2.00452

СЕРИЯ 001-011221

1. НАЗНАЧЕНИЕ: фармакопейный стандартный образец (ФСО) предназначен для определения активности (содержания анти-D-антител IgG) в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_0(D) методами гемагглютинации в геле (непрямая проба Кумбса) и иммуноферментным.

2. АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА: активность иммуноглобулина человека антирезус Rh_0(D) (содержание анти-D-антител IgG): 516 МЕ/мл (103 мкг/мл), расширенная неопределенность: ± 100 МЕ/мл (± 20 мкг/мл) (коэффициент охвата 2, уровень доверия 95%).

3. ОПИСАНИЕ, ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ: ФСО представляет собой иммуноглобулин человека антирезус Rh_0(D), прозрачный бесцветный раствор, 1 мл в ампуле. Прослеживаемость аттестованного значения ФСО к единицам МЕ установлена с использованием Международного стандартного образца анти-D иммуноглобулина - 3rd WHO International standard anti-D Immunoglobulin, NIBSC code: 16/332. Содержание белка: 9,6 %. Молекулярные параметры: мономеры и димеры – 98,42%, полимеры – 0,09%, фрагменты – 1,18%, агрегаты - 0%.

4. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ: в соответствии с ОФС.1.8.2.0004.15 ГФ РФ и инструкцией по применению.

5. КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ: 1 ампула по 1 мл, паспорт, инструкция по применению.

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ: ФСО должен храниться при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте. Транспортирование всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С.
Стабильность значений аттестованной характеристики в течение срока годности ФСО гарантируется при соблюдении условий транспортирования, хранения и порядка применения.

7. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ: материал ФСО предназначен для лабораторных испытаний и не предназначен для введения людям.

8. ДАТА ВЫПУСКА: 22.12.2021 г.

9. СРОК ГОДНОСТИ: 01.02.2024 г.

Начальник Испытательного центра экспертизы качества МИБП
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России А.А. Мовсесянц

МП

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Юридический адрес: 127051, Москва, Петровский бульвар, д.8, стр.2, тел. (495) 625-43-48, 625-43-42
Фактический адрес: 119002,Москва, пер. Сивцев Вражек, д.41, стр. 1,3 тел. (499) 190-18-18, доб. 64-57

«УТВЕРЖДАЮ»
Начальник
Испытательного центра экспертизы качества МИБП
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

А.А. Мовсесянц

«12» _____ 20 21 г.

Инструкция по применению

ФАРМАКОПЕЙНЫЙ СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ФАРМАКОПЕИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(отраслевой)

СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА АНТИРЕЗУС Rh_0(D)

(содержание анти-D-антител IgG)

ФСО 3.1.000452

СЕРИЯ: 001-011221

МОСКВА
2021

1. ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ

1.1. Инструкция устанавливает порядок и условия применения фармакопейного стандартного образца Государственной Фармакопеи Российской Федерации «Стандартный образец активности иммуноглобулина человека антирезус $Rh_0(D)$ (содержания анти-D-антител IgG)» (далее - ФСО) при определении анти-D-антител IgG в лекарственных препаратах иммуноглобулина человека антирезус $Rh_0(D)$.

1.2. Наличие и правильность маркировки, целостность ампул ФСО проводить путем внешнего осмотра. Проверку целостности ампулы со стандартным образцом проводят путем внешнего осмотра. Ампула не должен иметь трещин, надписи на этикетке флакона должны быть четкими. При обнаружении повреждения ампулы с ФСО ее следует уничтожить.

1.3. ФСО представляет собой прозрачную бесцветную жидкость. Проверять визуально в проходящем свете.

2. ПОДГОТОВКА К ПРИМЕНЕНИЮ

2.1. Все работы с данным ФСО должны проводиться на аттестованном и поверенном оборудовании.

2.2. Взять одну ампулу ФСО «Стандартный образец активности иммуноглобулина человека антирезус $Rh_0(D)$ (содержания анти-D-антител IgG)» и выдержать не менее 15 минут при комнатной температуре.

3. УСЛОВИЯ И ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ ФСО

Определение активности (содержания анти-D-антител IgG) в лекарственных препаратах иммуноглобулина человека антирезус $Rh_0(D)$ проводят методом гемагглютинации (непрямая проба Кумбса) «в геле» согласно методике ОФС.1.8.2.0004.15 «Испытание на анти-D-антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека», метод В или иммуноферментным (конкурентным прямым).

3.1. Гелевый метод.

Гелевый метод основан на использовании гелевой карты, представляющей собой пластиковый планшет с микропробирками, наполненными гелевыми колонками. Каждая микропробирка состоит из дозирующей/инкубационной камеры и колонки, содержащей полимеризованные микросферы декстрана в буферном растворе низкой ионной силы (LISS).

3.1.1. Приготовление растворов.

Подготовка испытуемого образца. Готовят разведение испытуемого образца с использованием солевого раствора (0,9 % раствор натрия хлорида или буферный раствор низкой ионной силы (LISS)) 1:1000. Далее из полученного раствора испытуемого образца с использованием того же растворителя готовят 0,9 кратные разведения, например, 1:30000, 1:35000, 1:40000, 1:45000, 1:50000, 1:55000, 1:60000, 1:65000.

Подготовка стандартного образца (СО) активности иммуноглобулина человека антирезус $Rh_0(D)$ (содержания анти-D-антител IgG). Готовят разведение СО с использованием солевого раствора (0,9 % раствор натрия хлорида или буферный раствор низкой ионной силы (LISS)) 1:1000. Далее из полученного раствора испытуемого образца с использованием того же растворителя готовят 0,9 кратные разведения, например, 1:30000, 1:35000, 1:40000, 1:45000, 1:50000, 1:55000, 1:60000, 1:65000.

3.1.2. Проведение испытания.

В дозирующую/инкубационную камеру микропробирки вносят по 25,0 мкл 0,8 % суспензии стандартных D-положительных эритроцитов человека 0(I) группы крови или по 25 мкл 0,8% суспензии стандартных D-отрицательных эритроцитов человека 0(I) группы крови (первый ряд), и по 25,0 мкл соответствующего разведения испытуемого образца (от 1:30000 до 1:65000) (второй ряд). Одновременно готовят пробы СО активности иммуноглобулина человека антирезус $Rh_0(D)$ (содержания анти-D-антител IgG): дозирующую/инкубационную камеру микропробирки вносят по 25,0 мкл 0,8 % суспензии стандартных D-положительных эритроцитов человека 0(I) группы крови (первый ряд) или по 25 мкл 0,8% суспензии стандартных D-отрицательных эритроцитов человека

0(I) группы крови (первый ряд) и по 25,0 мкл соответствующего разведения СО (от 1:30000 до 1:65000) (второй ряд).

Пробы инкубируют при температуре (37±0,5)°С в течение 30 мин. По окончании инкубации пробы центрифугируют (на специальной центрифуге для гелевых карт) в стандартных условиях (запрограммированный режим) и оценивают агглютинацию. Агглютинированные эритроциты распределяются в толще гелевой колонки или в ее верхней части. Неагглютинированные эритроциты оседают на дно микропробирки.

Проводят три повторных определения.

3.1.3. Оценка результатов.

Содержание анти-D-антител IgG (в титрах), определяют максимальным разведением препарата и стандартного образца, при котором наблюдают агглютинацию любой интенсивности.

3.1.4. Расчет.

Полученные титры стандартного и испытуемого образца используют для расчета активности (содержания анти-D-антител IgG) в МЕ/мл в препаратах иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$ по формуле:

$$A_{исп.} = \frac{Афсо \times Тобр.}{Тфсо} \times 0,2, \text{ где}$$

$A_{исп.}$ – содержание анти-D-антител IgG в испытуемом образце, мкг/мл;

$A_{фсо}$– содержание анти-D-антител IgG в стандартном образце, МЕ/мл;

$T_{исп.}$ – величина, обратная максимальному разведению испытуемого образца, при котором наблюдают агглютинацию;

$T_{фсо}$ – величина, обратная максимальному разведению стандартного образца, при котором наблюдают агглютинацию,

0,2 – коэффициент, применяется в случае пересчета МЕ/мл в мкг/мл.

3.1.5. Критерии приемлемости результатов:

- в микропробирках, содержащих суспензию D-отрицательных эритроцитов человека, агглютинация должна отсутствовать;
- доверительный интервал (при p=95%) трех результатов определения активности (содержания анти-D-антител IgG) в испытуемом образце должен находится в интервале от 80 до 120% значения отдельного результата определения.

3.2. Иммуноферментный метод (конкурентный прямой).

Метод основан на конкуренции биотинилированных моноклональных анти-D-антител (Ат) IgG с анти-D-Ат IgG в препарате иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$ за связывание со специфическим D-эпитопом D-антигенов (Аг) эритроцитов, иммобилизованными на твердой фазе. В качестве Аг для приготовления иммуносорбента рекомендуется использовать D-положительные эритроциты I(0) группы крови фенотипа R2R2, полученные не менее чем от 3-х доноров, а также допускается использование эритроцитов фенотипа R1R1 как альтернативного.

3.2.1. Приготовление иммуносорбента.

Предварительно готовят:

- фосфатно-солевой буферный раствор с pH 7,4, состоящий из 8,0 г/л натрия хлорида, 0,76 г/л безводного натрия гидрофосфата, 0,2 г/л калия хлорида, 0,2 г/л калия дигидрофосфата;
- 10% раствор папаина, состоящий из 1 г папаина, растворенного в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 5,4, затем проинкубированного в термостате при 37 °С в течение 30 минут и выдержанного после инкубации 15 минут при комнатной температуре, к которому далее добавляют 1 мл раствора L-цистеина с концентрацией 48,5 мг/мл и 1 мл натрия ЭДТА с концентрацией 3,7 мг/мл и доводят общий объем до 10 мл фосфатно-солевым буферным раствором с pH 5,4;
- фосфатно-солевой буферный раствор для иммобилизации эритроцитов с pH 7,0, состоящий из фосфатно-солевого буферного раствора с pH 7,4, в котором растворяют 18 г/л глюкозы, 10 г/л натрия цитрата, 0,7 г/л натрия ЭДТА;

- раствор глютеральдегида, состоящий из 0,5 г/л глютеральдегида, растворенного в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4.

Проводят процедуру отмывания эритроцитов от консервантов и остатков компонентов крови путем добавления 10 мл фосфатно-солевого буферного раствора с pH 7,4 в пробирку или флакон, затем суспензию эритроцитов центрифугируют при 1200 g в течение 3 мин, супернатант удаляют. Процедуру отмывания повторяют 4 раза. Получают осадок отмытых эритроцитов.

Затем осадок отмытых эритроцитов папаинизируют путем добавления к 1 объему эритроцитов 1 объема 10 % раствора папаина и последующего инкубирования суспензии при температуре 37°С в течение 15 минут.

Далее проводят отмывание папаинизированных эритроцитов от продуктов гидролиза путем добавления к суспензии 10 мл фосфатно-солевого буферного раствора с pH 7,4, центрифугированием при 1200 g в течение 3 мин и удалением супернатанта. Процедуру отмывания повторяют 3 раза. Получают осадок отмытых папаинизированных эритроцитов.

Готовят 0,2 % суспензию папаинизированных отмытых эритроцитов путем добавления к осадку фосфатно-солевого буферного раствора с pH 7,0.

Проводят иммобилизацию эритроцитов на поверхности твердой фазы путем внесения в лунки полистиролового планшета с максимальной сорбционной емкостью 650 нг белка/см^2 (MaxiSorp, Nunc, кат. № 44-2404-21 или аналогичные) по 50 мкл 0,2 % суспензии отмытых папаинизированных эритроцитов. Для фиксации эритроцитов на твердой фазе планшет с внесенной суспензией эритроцитов центрифугируют при 120 g в течение 3 минут при температуре не более 2-8 ˚С, затем, не удаляя суспензию эритроцитов, вносят в каждую лунку 100 мкл раствора глютеральдегида и выдерживают 10 мин, после чего жидкость из лунок планшета удаляют. Затем каждую лунку планшета промывают добавлением 300 мкл фосфатно-солевого буферного раствора с pH 7,4, процедуру отмывания повторяют 3 раза.

Полистироловый планшет с иммобилизованными эритроцитами представляет собой иммуносорбент.

3.2.2. Процедура ИФА.

Вносят в лунки иммуносорбента 250 мкл раствора 20 г/л бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре, по истечении времени раствор удаляют.

Приготовление растворов стандартного и испытуемого образцов.

Предварительно готовят 10 % трис-буферный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА), содержащий 8,0 г натрия хлорида, 0,6 г трис(гидроксиметил)аминометана, 1 г БСА. Далее готовят растворы стандартного образца с использованием ФСО в виде 5 последовательных двух кратных разведений, начиная с 30 МЕ/мл (30, 15, 7,5, 3,75, 1,8 МЕ/мл). Для этого в микроцентрифужную пробирку вместимостью 2,5 мл отбирают 0,1 мл раствора ФСО с активностью 516 МЕ/мл (содержание анти-D-Ат IgG - 103 мкг/мл), добавляют 1,62 мл 10 % трис-буферного раствора БСА и перемешивают, получая таким образом раствор стандартного образца с содержанием анти-D-Ат IgG 30 МЕ/мл. Далее путем двухкратного разведения полученного раствора готовят растворы стандартного образца с концентрациями 15, 7,5, 3,75, 1,8 МЕ/мл. Аналогичным образом готовят разведения испытуемого образца.

Вносят по 35 мкл разведений растворов стандартных образцов, приготовленных из ФСО, и разведения испытуемого образца в лунки планшета для разведения образцов. К каждому разведению добавляют 35 мкл меченых стандартных анти-D-Ат (Bio-BRAD-5, NIBSC 02/230). Все образцы вносят в трех повторностях. Затем по 50 мкл каждого образца переносят в лунки иммуносорбента. После инкубации в течение 1 часа при температуре 37 °С образованные иммунные комплексы «Аг-Ат» трехкратно отмывают от несвязавшихся Ат фосфатно-солевым буферным раствором с pH 7,4. Затем для выявления образованных иммунных комплексов «Аг-Ат» в каждую лунку иммуносорбента вносят 50 мкл авидин-стрептавидина, конъюгированного с щелочной фосфатазой (Sigma-Aldrich, кат. № 2636) и проводят инкубацию в течение 30 минут при комнатной температуре. После инкубации раствор из лунок иммуносорбента удаляют. Лунки иммуносорбента трехкратно промывают фосфатно-солевым буферным раствором с pH 7,4. Затем в

лунки вносят 100 мкл субстрата паранитрофенил фосфата (Sigma-Aldrich, кат. № N1891) и проводят инкубацию в течение 10 минут в темном месте. Реакцию останавливают внесением в лунки иммуносорбента 50 мкл 3М раствора натрия гидроксида.

3.2.3. Учет результатов.

Учет результатов проводят с использованием спектрофотометра при длине волны 405 нм.

Для расчета активности (содержание анти-D-Ат IgG) в препарате иммуноглобулина человека антирезус Rh_0(D) используют любую лицензионную программу статистической обработки результатов ИФА методом параллельных линий. Для пересчета из МЕ/мл в мкг/мл результат определения умножают на коэффициент пересчета - 0,2.

3.2.4. Критерии приемлемости результатов:

- относительное стандартное отклонение (RSD, %) трех значений оптической плотности (OE), для каждой концентрации растворов стандартного и испытуемого образцов не должен превышать 15%;
- коэффициент детерминации линейного диапазона (R^2) не менее 0,9;
- относительные значения содержания анти-D-Ат IgG в испытуемом образце должны быть в интервале от 80 до 120 % (± 20%) от номинального значения.

4. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

4.1. При работе пользуйтесь правилами техники безопасности, действующими на предприятии.

4.2. Материал ФСО предназначен для лабораторных испытаний in vitro и не предназначен для введения людям.

5. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

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

5.2. Вскрытые ампулы ФСО подлежат использованию в течение не более 7 дней.

5.3. Транспортирование – всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С.

Приложение Г

Проект Общей Фармакопейной статьи

Определение антирезус $Rh_o(D)$ антител иммуноглобулина G в препаратах иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$	**ОФС**

/Вводится впервые/

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы прямого конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) и гемагглютинации в геле для количественного определения антирезус $Rh_o(D)$ антител иммуноглобулинов G (анти-D-антител IgG) в препаратах иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$ для внутримышечного и внутривенного введения.

Для указанных методов обязательным является использование Международного стандартного образца (МСО) анти-D иммуноглобулина с аттестованным значением содержания анти-D-антител IgG в Международных единицах активности (МЕ) или мкг (1 МЕ = 5 мкг), или Фармакопейного стандартного образца (ФСО) биологического происхождения Государственной фармакопеи Российской Федерации – «Стандартный образец для определения активности иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$ (содержание анти-D-антител IgG)» или стандартного образца, калиброванного по отношению к указанным стандартным образцам. Подготовку стандартного образца проводят в соответствии с инструкцией по применению.

Испытание проводят любым из приведенных методов. В случае сомнений или разногласий окончательное заключение принимают на

основании результатов, полученных при проведении испытания методом ИФА (метод 1).

Норму содержания антирезус Rh_o(D) антител иммуноглобулина G в препарате иммуноглобулина человека антирезусRh_o(D) указывают в нормативной документации производителя.

Метод 1. Метод иммуноферментного анализа

Метод ИФА для количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) основан на конкурентном иммунохимическом связывании между анти-D-антителами IgG в препарате иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) и меченными (биотинилированными моноклональными) анти-D-антителами со специфическим эпитопом D-антигенов иммуносорбента (резус-положительных эритроцитов человека фенотипов R1R1 (CCDee) или R2R2 (ccDEE), иммобилизированных на твердой фазе. Количество меченных анти-D-антител, присоединившихся к эритроцитам иммуносорбента, снижается пропорционально содержанию в смеси исследуемых анти-D-антител IgG.

Приготовление растворов.

Фосфатно-солевой буферный раствор (ФБР) pH 7,4. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 8 г натрия хлорида, 0,76 г натрия гидрофосфата безводного, 0,2 г калия хлорида, 0,2 г калия дигидрофосфата, 0,2 г натрия азида, добавляют 900 мл воды очищенной и перемешивают. Доводят pH до 7,4 с помощью 0,1М раствора хлористоводородной кислоты. Общий объем раствора доводят до метки водой очищенной и перемешивают. Срок хранения раствора 1 месяц при температуре 2–8 ºС.

ФБР pH 5,4. ФБР pH 7,4 доводят до pH 5,4 с помощью 0,1М раствора хлористоводородной кислоты, добавляют воды очищенной и перемешивают. Срок хранения раствора 1 месяц при температуре 2–8 ºС.

10% раствор папаина. В пробирку вместимостью 10 мл помещают 1 г папаина, прибавляют 5 мл ФБР pH 5,4 и перемешивают. Затем в пробирку помещают 0,05 г L-цистеина и 0,04 г динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА натрия), общий объем доводят до метки ФБР pH 5,4 и перемешивают. Срок хранения раствора 1 сутки при температуре 2–8 ºС.

ФБР для фиксации клеток. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 18 г глюкозы, 10 г натрия цитрата, 0,7 г натрия ЭДТА, добавляют 900 мл ФБР pH 7,4 и перемешивают. Доводят pH до 7,0 с помощью 0,1М раствора хлористоводородной кислоты. Общий объем доводят до метки ФБР pH 7,4 и перемешивают. Срок хранения раствора 1 месяц при температуре 2–8 ºС.

0,05 % раствор глютеральдегида. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 500 мкл глютеральдегида, растворяют в 50 мл воды очищенной, общий объем доводят до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

2% раствор БСА. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2 г БСА, растворяют в ФБР с pH 7,4, доводят общий объем до метки и перемешивают. Срок хранения раствора 1 неделя при температуре 2–8 ºС.

1% раствор БСА. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1 г БСА, растворяют в воде очищенной, доводят общий объем до метки и перемешивают. Срок хранения раствора 1 неделя при температуре 2–8 ºС.

Раствор биотинилированныхмоноклональных анти-D-антител (BRAD-5 NIBSC) с концентрацией 0,25 мг/мл. Содержимое флакона восстанавливают в воде очищенной. К 1 мл восстановленного раствора добавляют 39 мл 1% раствора БСА и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Трис-буферный раствор с содержанием 1 % БСА. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 8 г натрия хлорида, 0,6 г

трис(гидроксиметил)аминометана, растворяют в 80 мл воды очищенной, доводят pH до 7,0 с помощью 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты. Затем добавляют 1 г БСА, растворяют, доводят общий объем до метки водой очищенной и перемешивают. Срок хранения раствора 1 неделя при температуре 2–8 ºС.

Раствор авидин-стрептовидина, конъюгированного с щелочной фосфатазой. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 50 мкл авидин-стрептовидина, конъюгированного с щелочной фосфатазой и доводят общий объем до метки трис буферным раствором с содержанием 1 % БСА. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор субстрата паранитрофенил фосфата. Готовят в соответствии с инструкцией по применению.

3 М раствор натрия гидроксида. В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 120 г (точная навеска) натрия гидроксида (ч.д.а.) и растворяют в 1 л воды очищенной. Срок хранения раствора 6 месяцев при комнатной температуре.

Приготовление иммуносорбента

3 мл консервированных или свежеприготовленных эритроцитов, полученных не менее, чем от трех доноров, отбирают в пробирку. Проводят процедуру их отмывания от консервантов и остатков компонентов крови путем добавления в пробирку 10 мл ФБР pH 7,4, последующим центрифугированием при 1200 g в течение 3 мин и удалением супернатанта. Процедуру отмывания повторяют 3 раза. Далее эритроциты папаинизируют добавлением к 1 объему эритроцитов 1 объема 10% раствора папаина и последующим инкубированием при температуре 37˚С в течение 10 мин. Затем папаинизированные эритроциты отмывают от продуктов гидролиза, как описано выше. Для иммобилизации эритроцитов готовят 0,2% суспензию папаинизированных отмытых эритроцитов с использованием ФБР для

фиксации клеток. Далее вносят по 50 мкл суспензии в лунки полистиролового прозрачного 96-луночного микропланшета с максимальной сорбционной емкостью и центрифугируют при 120g в течение 3 мин при температуре 4˚С. Затем вносят в лунки по 100 мкл раствора глютеральдегида, выдерживают 10 мин и удаляют стряхиванием. Планшет промывают вручную или с использованием прибора для отмывания планшетов 3 раза добавлением 300 мкл ФБР с pH 7,4 в каждую лунку. Допускается хранение иммуносорбента в течение 14 дней при температуре 2–8 ºС после добавления 150 мкл ФБР для фиксации клеток в каждую лунку иммуносорбента. Перед применением иммуносорбента ФБР для фиксации клеток удаляют из лунок путем стряхивания. Для исключения неспецифического связывания вносят в лунки по 250 мкл 2% раствора БСА и выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего раствор удаляют. Полистироловый планшет с иммобилизованными эритроцитами представляет собой иммуносорбент.

Пробоподготовка

Приготовление разведений испытуемого и стандартного образцов. Восстанавливают лиофилизированный препарат в соответствии с процедурой, приведенной в нормативной документации производителя. Готовят растворы стандартного и испытуемого образцов с концентрацией анти-D-антител IgG 30 МЕ/мл с использованием трис-буферного раствора с содержанием 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА). Затем готовят растворы стандартного и испытуемого образцов с концентрацией анти-D-антител IgG (15; 7,5; 3,75; 1,88 МЕ/мл) путем последовательного двукратного разведения с использованием того же растворителя.

Методика

Вносят по 35 мкл разведений растворов стандартного образца и разведений испытуемых образцов в лунки планшета для разведения образцов. Все образцы вносят в трех повторностях. К каждому разведению добавляют 35

мкл меченых анти-D-антител и аккуратно перемешивают путем легкого постукивания по планшету, не допуская разбрызгивания содержимого лунок. По 50 мкл каждого образца переносят в лунки иммуносорбента. В одну из лунок иммуносорбента вносят 50 мкл ФБР 7,4 в качестве отрицательного контрольного образца. После инкубации в течение 1 часа при температуре 37°С иммуносорбент трехкратно отмывают добавлением 300 мкл ФБР pH 7,4 в каждую лунку. В каждую лунку иммуносорбента вносят 50 мкл конъюгата и проводят инкубацию в течение 30 мин при комнатной температуре. По окончании инкубации раствор из лунок иммуносорбента удаляют. Иммуносорбент трехкратно промывают добавлением 300 мкл ФБР pH 7,4 в каждую лунку. В лунки вносят 100 мкл субстрата и проводят инкубацию в течение10 мин в темном месте. Реакцию останавливают внесением в лунки иммуносорбента 50 мкл 3М раствора натрия гидроксида.

Обработка результатов

Измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 405 нм относительно отрицательного контрольного образца. Расчет содержания анти-D-антител IgG (МЕ/мл) в препарате иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) проводят по уравнению, полученному при построении графика (доза-ответ) зависимости оптической плотности от концентрации растворов стандартного образца (логарифм значений содержания анти-D-антителIgG, МЕ/мл) с учетом разведения препарата по формулам (1, 2, 3):

$$C_i = A + B\ln [C_{ст}], \quad (1),$$

$$C_i = K \times exp(\frac{[ОП_и - A]}{B}), \quad (2),$$

$$C_{изм} = \frac{\sum_{i-1}^{n} Ci}{n}, \quad (3),$$

где:

C_i – содержание анти-D-антител IgG, при одном определении, МЕ/мл;

exp – функция для пересчета логарифма при построении линейного графика;
A, B – коэффициенты уравнения линейной регрессии калибровочного графика;
$C_{ст}$ – содержание анти-D-Ат IgG в растворе стандартного образца, МЕ/мл; $ОП_{и}$ – оптическая плотность испытуемого образца, ОЕ;
К – коэффициент разведения испытуемого образца;
$C_{изм}$– среднее значение содержания анти-D-антител IgG, рассчитанное по трем определениям, МЕ/мл;
n – количество определений.

Также для расчета содержания анти-D-антител IgG в препарате иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) могут быть использованы подходящие лицензионные программы для статистической обработки результатов ИФА, валидированные производителем лекарственного препарата.

Критерии оценки приемлемости результатов:

- относительные значения содержания анти-D-антител IgG в испытуемом образце должны быть в интервале от 80 до 120 % (± 20%) от номинального значения;
- коэффициент детерминации (R^2) зависимости оптической плотности от концентрации растворов стандартного образца при построении калибровочного графика должен быть не менее 0,9;
- относительное стандартное отклонение (RSD,%) трех значений оптической плотности для каждой концентрации стандартного и испытуемого образцов не должно превышать 20 %.

Метод 2. Метод гемагглютинации в геле

Для количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) методом гемагглютинации в геле применяют гелевые карты, представляющие собой пластиковый планшет с

микропробирками. Каждая микропробирка состоит из дозирующей/инкубационной камеры и колонки, наполненной раствором геля. Раствор геля содержит смесь поликлонального античеловеческого глобулина (анти-IgG) и моноклональных анти-C3d-антител. Агглютинированные резус-положительные эритроциты человека фенотипов ccDEE или CCDee в результате взаимодействия с анти-D-антителами IgG препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) при прохождении через колонку карты удерживаются в верхней или средней части колонки, не агглютинированные эритроциты скапливаются в нижней части микропробирки, образуя осадок. Последнее разведение испытуемого образца, при котором наблюдают агглютинацию любой интенсивности, принимают за титр анти-D-антител IgG. Если агглютинация эритроцитов наблюдается во всех разведениях испытуемого образца, то титр анти-D-антител IgG выше, чем используемые разведения. В этом случае повторяют испытания, приготовив б'ольшие разведения испытуемого образца.

Пробоподготовка

Приготовление разведений стандартного и испытуемого образцов. Восстанавливают лиофилизат препарата. Описание процедуры восстановления приводят в нормативной документации производителя. Готовят растворы стандартного образца с разведением 1:1000 с использованием 0,9% раствора натрия хлорида. Далее из полученного раствора стандартного образца с использованием того же растворителя готовят 0,9 кратные разведения, например, для образца МСО готовят разведения: 1:18000, 1:20000, 1:22000, 1:24000, 1:26000, 1:28000, 1:30000, 1:32000; для образца ФСО готовят разведения: 1:35000, 1:40000, 1:45000, 1:50000, 1:55000, 1:60000, 1:65000, 1:70000. Аналогичным образом готовят разведения испытуемого образца. Примеры приготовления разведений представлены в таблицах 1,2.

Таблица 1 - Пример приготовления разведений МСО

№ разведения	Объём раствора МСО, мл	Концентрация раствора МСО, титры	Объём прибавляемого 0,9% растворaNaCl, мл	Конечная концентрация раствора МСО, титры
1	0,1	-	0,9	1:10
2	0,1	1:10	0,9	1:100
3	**0,1**	**1:100**	**0,9**	**1:1000**
4	0,1	1:1000	1,7	1:18000
5	0,1	1:1000	1,9	1:20000
6	0,1	1:1000	2,1	1:22000
7	0,1	1:1000	2,3	1:24000
8	0,1	1:1000	2,5	1:26000
9	0,1	1:1000	2,7	1:28000
10	0,1	1:1000	2,9	1:30000
11	0,1	1:1000	3,1	1:32000

Таблица 2 - Пример приготовления разведений ФСО или испытуемого образца

№ разведения	Объём раствора ФСО или испытуемого образца, мл	Концентрация раствора ФСО или испытуемого образца, титры	Объем прибавляемого 0,9% растворaNaCl, мл	Конечная концентрация раствора ФСО или испытуемого образца, титры
1	0,1	-	0,9	1:10
2	0,1	1:10	0,9	1:100
3	**0,1**	**1:100**	**0,9**	**1:1000**
4	0,1	1:1000	3,4	1:35000
5	0,1	1:1000	3,9	1:40000
6	0,1	1:1000	4,4	1:45000
7	0,1	1:1000	4,9	1:50000
8	0,1	1:1000	5,4	1:55000
9	0,1	1:1000	5,9	1:60000
10	0,1	1:1000	6,4	1:65000
11	0,1	1:1000	6,9	1:70000

Методика

В 8 дозирующих/инкубационных камер микропробирки гелевой карты вносят по 25,0 мкл 0,8 % суспензии D-положительных эритроцитов человека 0(I) группы крови или по 25 мкл 0,8% суспензии стандартных D-отрицательных эритроцитов человека 0(I) группы крови, затем вносят по 25,0 мкл соответствующего разведения испытуемого образца. Одновременно аналогичным образом готовят гелевую карту с использованием соответствующих разведений стандартного образца. Гелевые карты с испытуемым и стандартным образцами инкубируют при температуре (37±0,5) °С в течение 30 мин. По окончании инкубации гелевые карты центрифугируют на специальной центрифуге для гелевых карт в запрограммированном режиме и оценивают наличие агглютинации. Агглютинированные эритроциты распределяются в толще гелевой колонки или в ее верхней части. Не агглютинированные эритроциты оседают на дно микропробирки. Проводят три повторных определения.

Содержание анти-D-антител IgG определяют по максимальному разведению препарата и стандартного образца, при котором наблюдают агглютинацию любой интенсивности (в титрах).

Полученные титры стандартного и испытуемого образцов используют для расчета содержания анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус $Rh_o(D)$ в МЕ/мл (или мкг) по формуле (4):

$$A_{исп.}=\frac{AcoxTисп.}{Tco} \text{ x } 0,2 \qquad (4),$$

где:

$A_{исп}$ – содержание анти-D-антител IgG в испытуемом образце, МЕ/мл;

$A_{со}$ – содержание анти-D-антител IgG в стандартном образце, МЕ/мл;

$T_{исп}$ – величина, обратная максимальному разведению испытуемого образца, при котором наблюдают агглютинацию;

T_{co} – величина, обратная максимальному разведению стандартного образца, при котором наблюдают агглютинацию,

0,2 – коэффициент, применяется при необходимости пересчета МЕ/мл в мкг/мл.

Критерии оценки приемлемости результатов:

- в микропробирках, содержащих суспензию D-отрицательных эритроцитов человека, агглютинация должна отсутствовать;
- доверительный интервал (при p=95%) трех результатов определения содержания анти-D-антител IgG в испытуемом образце должен находится в интервале от 80 до 120% значения отдельного результата определения.