

Оценка стабильности аналитической работы методики определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека

О. Г. Корнилова*, Е. А. Хуснатдинова, Е. С. Коновалова, Р. А. Волкова

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Оценка уровня антикомплементарной активности, являясь обязательной составляющей контроля качества лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека, сопряжена с необходимостью использования в методике целого ряда трудно стандартизуемых реагентов биологического происхождения. С целью стандартизации методики контроля качества препаратов по показателю «Антикомплементарная активность» целесообразно использование стандартного образца, который позволяет установить соответствие критериям приемлемости результатов, а также оценить стабильность аналитической работы. **Цель работы:** оценка стабильности аналитической работы методики при проведении испытаний лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека по показателю «Антикомплементарная активность» с использованием стандартных образцов иммуноглобулинов человека различной квалификации. **Материалы и методы:** антикомплементарную активность определяли в реакции связывания комплемента в соответствии с ОФС.1.8.2.0007.15 Государственной фармакопеи Российской Федерации (XIV изд.) с использованием различных серий комплемента морских свинок и эритроцитов барана. Для стандартизации методики применяли стандартный образец иммуноглобулина человека ОСО 42-28-430-2018 и стандартный образец иммуноглобулина человека (антикомплементарная активность и молекулярные параметры) BRP серия 1 (кат. № Y0001504). По результатам определения уровня антикомплементарной активности этих стандартов осуществляли построение контрольных карт Шухарта, используя аттестованные значения в качестве контрольных границ. **Результаты:** анализ построенных карт Шухарта позволил оценить тренды, влияние различных серий комплемента морских свинок, эритроцитов барана на стабильность аналитической работы методики определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека.

Выводы: использование ОСО 42-28-430-2018 в методике контроля качества препарата иммуноглобулина человека по показателю «Антикомплементарная активность» в сочетании с контрольными картами Шухарта позволяет контролировать процесс анализа, оценивать его изменения, связанные со сменой серии реагентов. В то же время стандартный образец Европейской фармакопеи, имея широкий диапазон допустимых значений, может быть использован лишь для подтверждения приемлемости результатов. Дополнительные исследования по установлению среднего значения уровня антикомплементарной активности контролей, а также стандартного отклонения могут расширить возможности использования этого стандарта для оценки стабильности аналитической работы методики.

Ключевые слова: лекарственные препараты иммуноглобулинов человека; антикомплементарная активность; стандартизация методики; стабильность аналитической работы; карты Шухарта

Для цитирования: Корнилова ОГ, Хуснатдинова ЕА, Коновалова ЕС, Волкова РА. Оценка стабильности аналитической работы методики определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2019;19(2):118–123. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-2-118-123>

Контактное лицо: Корнилова Ольга Геннадьевна; Kornilova@expmed.ru

Evaluation of the Stability of Performance of the Analytical Test Method Used for Determination of Anticomplementary Activity of Human Immunoglobulin Preparations

O. G. Kornilova*, E. A. Khusnatdinova, E. S. Konovalova, R. A. Volkova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

The evaluation of anticomplementary activity, being an obligatory component of the quality control of human immunoglobulin preparations, requires the use of a number of reagents of biological origin that are difficult to standardise. In order to standardise the quality control method used for determination of anticomplementary activity it is advisable to use a reference standard which demonstrates whether obtained results comply with the acceptance criteria, and helps to assess the stability of analytical performance. **The aim of the study** was to assess the stability of analytical performance of the test procedure used for determination of anticomplementary activity of human immunoglobulin preparations using human immunoglobulin reference standards of various grades. **Materials and methods:** anticomplementary activity was determined by the complement fixation test in accordance with the general monograph of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (14th ed.) OFS.1.8.2.0007.15 using different batches of guinea pig complement and sheep red blood cells. The test procedure was standardised using the OSO 42-28-430-2018 human immunoglobulin reference standard and the

human immunoglobulin BRP, batch 1 (cat. No. Y0001504). The obtained results of anticomplementary activity of the reference standards were used to construct Shewhart control charts, using the certified values as control limits.

Results: the analysis of the constructed Shewhart charts helped to assess trends, and estimate the influence of different batches of guinea pig complement and sheep red blood cells on the stability of analytical performance of the test procedure used for determination of anticomplementary activity of human immunoglobulin preparations.

Conclusions: the use of the OSO 42-28-430-2018 reference standard in combination with Shewhart control charts for the quality control of human immunoglobulin preparations in terms of Anticomplementary activity makes it possible to control the testing process, and assess any of its changes associated with the replacement of the batch of the reagent. At the same time, the reference standard of the European Pharmacopoeia, which has a wide range of permissible values, can only be used to confirm the acceptance of the results. Further studies to determine the mean value of the anticomplementary activity of control samples, as well as the standard deviation, may increase the possibilities of using this reference standard for assessment of analytical performance stability.

Key words: human immunoglobulin preparations; anticomplementary activity; test method standardisation; analytical performance stability; Shewhart charts

For citation: Kornilova OG, Khusnatdinova EA, Konovalova ES, Volkova RA. Evaluation of the stability of performance of the analytical test method used for determination of anticomplementary activity of human immunoglobulin preparations. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(2):118–123. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-2-118-123>

Corresponding author: Olga G. Kornilova; Kornilova@expmed.ru

Антикомплементарная активность (АКА) является свойством иммуноглобулинов человека (ИГЧ), которое при величине более 50% (что соответствует 1 CH_{50} на 1 мг белка) обуславливает при внутривенном введении такие нежелательные реакции, как приливы, головная боль, лихорадка, тахикардия [1, 2]. Оценка соответствия качества инфузионных лекарственных препаратов ИГЧ по показателю «Антикомплементарная активность» является обязательным требованием обеспечения специфической безопасности иммуноглобулинотерапии¹. Необходимость использования в методике определения АКА, основанной на реакции связывания комплемента, нестандартизованных реагентов биологического происхождения (эритроциты барана, комплемент морской свинки, гемолитическая сыворотка), а также чувствительность реакции связывания комплемента к температурным условиям ее осуществления обуславливают высокую вариабельность/изменчивость результатов [3]. Современные требования к обеспечению качества аналитических работ при испытаниях лекарственных препаратов как на этапе внутрипроизводственного контроля, так и при подтверждении соответствия требованиям нормативной документации предполагают наличие процедур управления качеством для того, чтобы контролировать достоверность результатов проведенных испытаний (анализа). Одним из элементов системы менеджмента качества является оценка стабильности аналитической работы. Для осуществления внутрилабораторного контроля качества (стабильности) результатов анализа по показателю «Антикомплементарная активность» в контрольной/испытательной лаборатории в качестве средства контроля целесообразно использовать стандартный образец (СО) иммуноглобулина человека, аттестованный по уровню АКА в различных диапазонах доз. В соответствии с ОФС.1.8.2.0007.15 Государственной фармакопеи Российской Федерации (XIV изд.) использование СО иммуноглобулина человека позволяет оценить приемлемость полученных результатов². Следить за возможными трендами в результатах испытаний и оперативно принимать меры для обеспечения надлежащего качества испытаний позволяют контрольные карты Шухарта³. Их использование предусмотрено РМГ 76–2014⁴ при выполнении работ по внутрилабораторному

контролю качества результатов количественного химического анализа. Для методик испытаний (анализа), основанных на биологических эффектах, отсутствуют регламентированные указания о порядке проведения оценки стабильности аналитической работы в связи со сложностью унификации требований к таким работам. Наибольшую сложность представляет выбор средства контроля, который может быть стандартным образцом, рабочей пробой с известной добавкой определяемого компонента, рабочими пробами, анализируемыми с использованием разных навесок (аликвот) и др. Для оценки стабильности результатов определения АКА лекарственных препаратов ИГЧ не применимо использование рабочих проб. В то же время получение сопоставимых результатов внутрипроизводственного контроля и анализа в испытательных лабораториях возможно только при условии использования единых средств контроля качества результатов испытаний. Это может быть только доступный для коммерческого приобретения СО соответствующей квалификации, который в совокупности с контрольными картами Шухарта позволяет оценивать качество получаемых результатов, устанавливать причины появляющихся изменений, их категоризировать и оперативно управлять качеством испытаний. В настоящее время на территории Российской Федерации такими СО являются СО Европейской фармакопеи BRP, серия 1 (кат. № Y0001504)⁵ и СО иммуноглобулина человека ОСО 42-28-430 [4].

Цель исследования — оценка стабильности аналитической работы методики при проведении испытаний лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека по показателю качества «Антикомплементарная активность» с использованием стандартных образцов иммуноглобулина человека различной квалификации.

Материалы и методы

Материалы

- гемолитические сыворотки производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия;
- пулированный комплемент морских свинок («in house»), серии 1, 2, 3;
- кровь баранья цитратная для питательных сред, стерильная, производства ЗАО «ЭКОлаб», Россия, серии 32/18, 44/18;

¹ Фармакопейная статья 3.3.2.0008.15 Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

² Общая фармакопейная статья 1.8.2.0007.15 Определение антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

³ ГОСТ Р ИСО 7870-1-2011 Статистические методы. Контрольные карты. Часть 1. Общие принципы.

⁴ РМГ 76-2014 ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

⁵ European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). <https://www.edqm.eu>

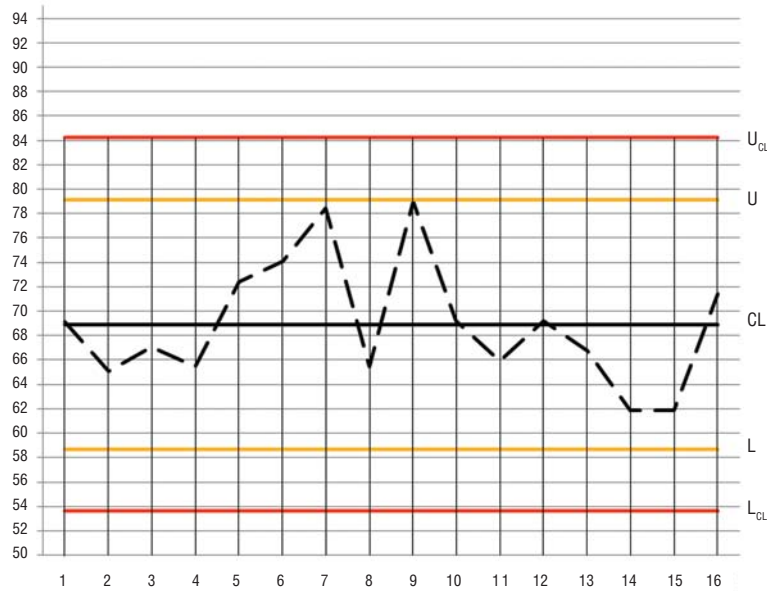


Рис. 1. Контрольная карта для оценки стабильности аналитической работы в испытаниях по показателю «Антикомплементарная активность» с использованием положительного компонента ОСО 42-28-430-2018. Ось ординат — антикомплементарная активность (%); ось абсцисс — порядковый номер испытания. U_{CL} и L_{CL} — верхняя и нижняя контрольные границы, U и L — верхняя и нижняя границы поля допуска, CL — центральная линия.

Fig. 1. A control chart for evaluating the stability of analytical performance of the test procedure used for determination of anticomplementary activity using a positive component of the OSO 42-28-430-2018 reference standard. Y axis — anticomplementary activity (%); X axis — number of the test. U_{CL} and L_{CL} — upper and lower control limits, U and L — upper and lower limits of the tolerance band, CL — central line.

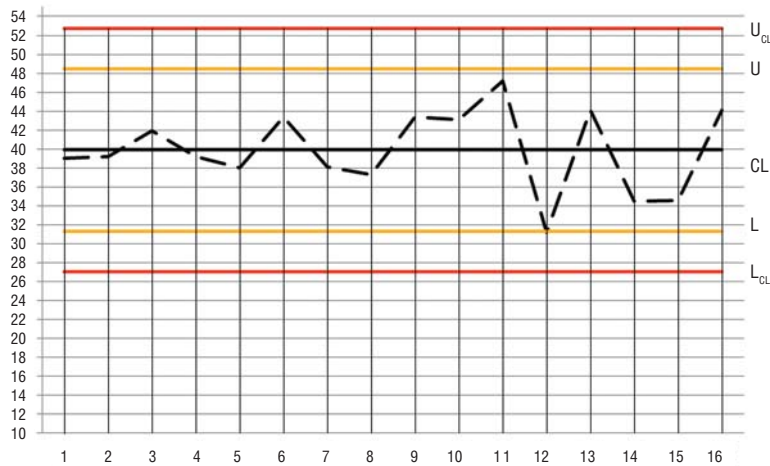


Рис. 2. Контрольная карта для оценки стабильности аналитической работы в испытаниях по показателю «Антикомплементарная активность» с использованием отрицательного компонента ОСО 42-28-430-2018. Ось ординат — антикомплементарная активность (%); ось абсцисс — порядковый номер испытания. U_{CL} и L_{CL} — верхняя и нижняя контрольные границы, U и L — верхняя и нижняя границы поля допуска, CL — центральная линия.

Fig. 2. A control chart for evaluating the stability of analytical performance of the test procedure used for determination of anticomplementary activity using a negative component of the OSO 42-28-430-2018 reference standard. Y axis — anticomplementary activity (%); X axis — number of the test. U_{CL} and L_{CL} — upper and lower control limits, U and L — upper and lower limits of the tolerance band, CL — central line.

- кровь баранья консервированная для реакции связывания комплемента, производства ЗАО «ЭКОлаб», Россия, серии 45/18, 48/18, 07/19;

- стандартный образец иммуноглобулина человека ОСО 42-28-430-2018 (серия 3) с аттестованным значением антикомплементарной активности: отрицательного контроля — $38,7 \pm 9,0\%$; положительного контроля — $69,9 \pm 9,6\%$ с доверительной вероятностью 0,95;

- стандартный образец иммуноглобулина человека (АКА и молекулярные параметры) Европейской фармакопеи BRP, серия 1 (кат. № Y0001504) с аттестованным значением антикомплементарной активности: отрицательного контроля — 10–40%; положительного контроля — 60–100%.

Методы

Антикомплементарную активность препаратов иммуноглобулина человека определяли в реакции связывания ком-

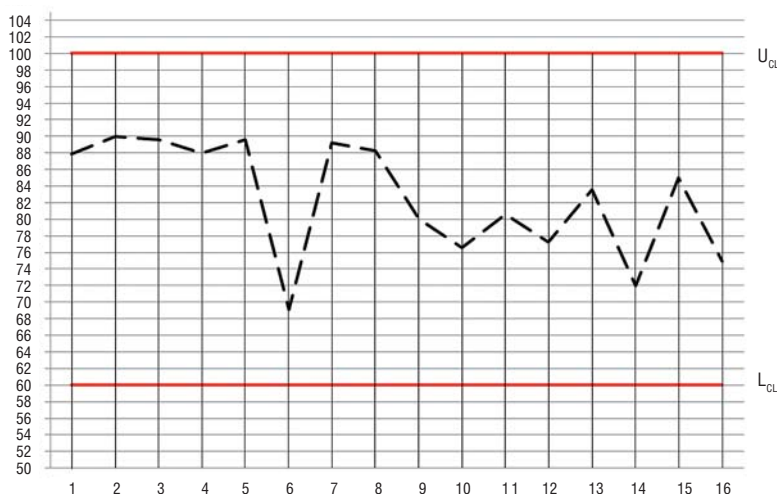


Рис. 3. Контрольная карта для оценки стабильности аналитической работы в испытаниях по показателю «Антикомплементарная активность» с использованием положительного контроля стандартного образца BRP Y0001504. Ось ординат — антикомплементарная активность (%); ось абсцисс — порядковый номер испытания. UCL и LCL — верхняя и нижняя контрольные границы.

Fig. 3. A control chart for evaluating the stability of analytical performance of the test procedure used for determination of anticomplementary activity using BRP Y0001504 (positive control). Y axis — anticomplementary activity (%); X axis — number of the test. UCL and LCL — upper and lower control limits.

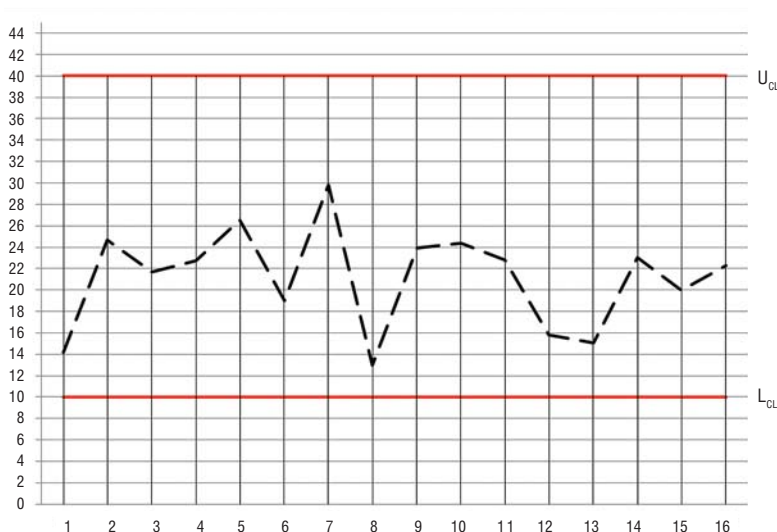


Рис. 4. Контрольная карта для оценки стабильности аналитической работы в испытаниях по показателю «Антикомплементарная активность» с использованием отрицательного контроля стандартного образца BRP Y0001504. Ось ординат — антикомплементарная активность (%); ось абсцисс — порядковый номер испытания. UCL и LCL — верхняя и нижняя контрольные границы.

Fig. 4. A control chart for evaluating the stability of analytical performance of the test procedure used for determination of anticomplementary activity using BRP Y0001504 (negative control). Y axis — anticomplementary activity (%); X axis — number of the test. UCL and LCL — upper and lower control limits.

племента в соответствии с ОФС.1.8.2.0007.15⁶. Построение контрольных карт Шухарта осуществляли по полученным результатам в соответствии с ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015⁷.

Результаты и обсуждение

Стандартизация методики определения АКА препаратов ИГЧ достигается при использовании СО. Соответствие уровня АКА положительного и отрицательного контролей аттестованным

значениям является основным критерием приемлемости результатов испытаний. На процесс выполнения методики оказывают влияние различные факторы, приводящие либо к случайной изменчивости (случайные, общие факторы), либо к изменчивости контролируемой, от преваширования которых и будет зависеть наличие управляемости испытаний. Инструментом статистического анализа процесса являются контрольные карты Шухарта, представляющие собой графики, на которых по горизонталь-

⁶ Общая фармакопейная статья 1.8.2.0007.15 Определение антикомплементарной активности лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁷ ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.

ной оси откладывают порядковый номер серии измерений, а по вертикальной — результаты измерения. Для оценки стабильности аналитической работы на карты наносят графическое обозначение среднего значения анализируемого показателя (центральная линия), а также линии, обозначающие контрольные границы на расстоянии трех стандартных отклонений вверх и вниз от среднего значения. Контрольные границы для доверительной вероятности $P = 0,997$ являются тем пределом, выход результатов за который свидетельствует о воздействии на процесс «особых факторов», которые могут и должны быть выявлены и устранены, а результаты испытаний (анализа) до их устранения должны расцениваться как не соответствующие критерию приемлемости.

Статистически управляемое (контролируемое) состояние процесса испытаний (анализа) — это состояние процесса испытаний (анализа), изменчивость которого определяется действием только случайных (общих) факторов. Для оперативного контроля за процессом испытаний (анализа) существенное значение имеет наличие возможности выявлять пограничные состояния, свидетельствующие о возрастающей тенденции к потере статистической управляемости, но результаты испытаний (анализа) при этом еще не выходят за критерии приемлемости. С этой целью на карту Шухарта наносят на расстоянии двух стандартных отклонений (также вверх и вниз от среднего значения) дополнительные линии, которые обозначают границы поля допуска для доверительной вероятности $P = 0,95$. Эти границы являются «пределами предупреждения», выход результатов за которые указывает на большую вероятность того, что в процессе выполнения методики происходят изменения. Кроме того, визуальная оценка расположения на карте точек, соответствующих результатам испытаний, позволяет в ряде случаев определить динамику развития процесса, которая проявляется в необычном их расположении и даже при отсутствии выхода за контрольные границы свидетельствует о нестабильности процесса. В соответствии с ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015⁸ это могут быть такие тренды, как девять точек подряд, находящихся выше средней линии; шесть возрастающих точек подряд; две из трех последовательных точек, находящихся выше предела предупреждения; четыре из пяти последовательных точек, находящихся выше половинной границы зоны предупреждения, и т. д.

В лаборатории Испытательного центра ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России был использован графический способ контроля показателей качества результатов испытаний лекарственных препаратов ИГЧ по уровню АКА с одновременным применением стандартных образцов СО 42-28-430-2018 (серия 3) и BRP, Y0001504 (серия 1) с использованием различных серий комплемента и эритроцитов барана. На рисунках 1 и 2 представлены контрольные карты, демонстрирующие стабильность процесса испытаний в диапазоне положительных значений (более 50 %) и в диапазоне отрицательных значений (менее 50 %) соответственно с применением положительного и отрицательного контролей СО 42-28-430-2018. На карту нанесены центральная линия, соответствующая аттестованному значению АКА для используемой серии СО, границы поля допуска, соответствующие двум стандартным отклонениям аттестованного значения АКА, а также контрольные границы, соответствующие интервалу трех стандартных отклонений.

Графическое расположение результатов испытаний СО 42-28-430-2018 внутри полей допуска свидетельствует об управляемости процесса испытаний. Анализ графиков с учетом используемых наименований и серий реагента эри-

троцитов барана (точки с 1 по 4 — кровь баранья цитратная, серия 32/18, точки 5 и 6 — серия 40/18, точка 7 — серия 44/18; точка 8 — кровь баранья консервированная для реакции связывания комплемента, серия 45/18, точки с 9 по 12 — серия 48/18, остальные точки — серия 07/19) позволяет сделать вывод об отсутствии трендов, связанных с влиянием смены реагента на стабильность результатов анализа. Комплемент морских свинок также не вызывает формирование трендов в результатах испытаний: точки с 1 по 6 — серия 1, с 7 по 10 — серия 2, с 11 по 16 — серия 3.

На рисунках 3 и 4 представлены контрольные карты, характеризующие процесс испытаний в диапазоне положительных значений (более 50 %) и в диапазоне отрицательных значений (менее 50 %) соответственно с применением положительного и отрицательного контролей СО BRP, Y0001504. На карту нанесены диапазоны, соответствующие аттестованному значению АКА для используемой серии СО, которые могут быть использованы в качестве контрольных границ. Графическое расположение результатов испытаний СО BRP, Y0001504 внутри диапазона аттестованных значений свидетельствует лишь о приемлемости результатов, однако судить о наличии или отсутствии управляемости процесса испытаний сложно, так как нельзя оценить тренды при отсутствии среднего значения и стандартных отклонений.

Тем не менее в случае подтверждения достижения статистической управляемости процесса испытаний в конкретной лаборатории с применением в качестве средства контроля качества испытаний СО 42-28-430-2018, в дальнейшем возможно получение дополнительных данных для СО BRP (среднее значение, стандартное отклонение), которые позволят использовать его для внутрилабораторного контроля качества (стабильности) результатов анализа по показателю «Антикомплемментарная активность».

Заключение

Таким образом, установлено, что использование контрольных карт Шухарта и СО 42-28-430-2018 позволяет подтвердить стабильность аналитической работы методики при проведении испытаний лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека по показателю качества «Антикомплемментарная активность» и оценить возможные тенденции к изменению процесса испытаний (анализа). Для использования СО BRP с целью оценки процесса по появлению трендов необходимо получение дополнительных сведений (среднего значения уровня АКА и стандартного отклонения) в рамках дополнительных исследований в условиях испытательной/контрольной лаборатории.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

Acknowledgments. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00154-19-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590046-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

⁸ ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта.

Литература/References

1. Buchacher A, Schluga P, Müllner J, Schreiner M, Kan-nicht C, Weinberger J. Anticomplementary activity of IVIG concentrates — important assay parameters and impact of IgG polymers. *Vox Sang.* 2010;98(3 Pt 1):209–18. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01271.x>
2. Аверченков ВМ, Палагин ИС. Внутривенные иммуноглобулины: механизмы действия и возможности клинического применения. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2004;6(3):273–81. [Avertchenkov VM, Palagin IS. Intravenous immunoglobulins: mechanisms of action and possible clinical applications. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2004;6(3):273–81 (In Russ.)]
3. Кривых МА, Корнилова ОГ, Бунятян НД, Кудашева ЭЮ. Разработка фармакопейной методики определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека. *Химико-фармацевтический журнал.* 2016;50(5):47–9. [Krivykh MA, Kornilova OG, Bunyatyan ND, Kudasheva EYu. Development of pharmacopoeial methods for determining the anticomplementary activity of human immunoglobulin preparations. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2016;50(5):47–9 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2016-50-5-47-49>
4. Кривых МА, Корнилова ОГ, Кудашева ЭЮ. Способ получения положительного контроля стандартного образца иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека, и стандартный образец иммуноглобулина человека для определения антикомплементарной активности препаратов иммуноглобулинов человека. Патент Российской Федерации № 2577703; 2016. [Krivykh MA, Kornilova OG, Kudasheva EYu. Method for producing positive control standard sample of human immunoglobulin to determine anticomplementary activity of preparations of human immunoglobulin, and standard sample of human immunoglobulin to determine anticomplementary activity of preparations of human immunoglobulin. Patent of the Russian Federation No. 2577703; 2016 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Корнилова Ольга Геннадьевна, канд. мед. наук. *Olga G. Kornilova*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1439-2052>

Хуснатдинова Екатерина Александровна, канд. биол. наук. *Ekaterina A. Khusnatdinova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8493-9688>

Коновалова Екатерина Сергеевна. *Ekaterina S. Konovalova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-8302-9962>

Волкова Рауза Асхатовна, д-р биол. наук. *Rausa A. Volkova*, Dr. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>

Поступила 14.05.2019

После доработки 16.05.2019

Принята к публикации 16.05.2019

Received 14 May 2019

Revised 16 May 2019

Accepted 16 May 2019