



Особенности разработки, аттестации и применения фармакопейного стандартного образца содержания иммуноглобулинов класса А в препаратах иммуноглобулинов человека для парентерального применения

А.В. Нечаев^{1✉}, Э.Ю. Кудашева¹, Е.Л. Постнова¹, Р.А. Волкова¹, О.В. Фадейкина¹, И.В. Борисевич², А.А. Мовсесянц¹

¹ 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

² Федеральное медико-биологическое агентство, Волоколамское ш., д. 30, Москва, 123182, Российская Федерация

✉ Нечаев Алексей Викторович; Nechaev@expmed.ru

Резюме

Актуальность. Оценку содержания примеси иммуноглобулинов класса А (IgA) в парентеральных лекарственных формах препаратов иммуноглобулинов человека необходимо проводить в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) методами кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием стандартного образца. Международным стандартным образцом (МСО) содержания IgA аттестован с использованием весового метода и метода радиальной иммунодиффузии. В настоящее время стандартный образец содержания IgA в препаратах иммуноглобулинов человека, аттестованный с использованием трех фармакопейных методов, отсутствует, что не позволяет сопоставить результаты, полученные разными методами, и может стать причиной некорректной оценки содержания нежелательной примеси IgA.

Цель. Определить порядок разработки, аттестации и применения фармакопейного стандартного образца (ФСО) содержания IgA в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека.

Материалы и методы. Исследуемые образцы кандидата в ФСО содержания IgA изготавливали с использованием субстанции «Плазма человека для фракционирования». Определение содержания IgA проводили методами кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и ИФА с использованием коммерчески доступных наборов реагентов и МСО. Определение содержания примеси IgA проводили в образцах коммерчески доступных препаратов иммуноглобулинов человека различных производителей. Использовали методы описательной статистики и дисперсионного анализа с применением программ Microsoft Excel и Statistica 10.0.

Результаты. Разработан ФСО с аттестованной характеристикой содержания IgA: 1,98 мг/мл (расширенная неопределенность 0,44 мг/мл; коэффициент охвата $k=2$; уровень доверия 95%) – для количественного определения содержания примеси IgA в препаратах иммуноглобулинов человека методами радиальной иммунодиффузии и ИФА; от 1,31 до 2,64 мг/мл (расширенная неопределенность 0,67 мг/мл; коэффициент охвата $k=3$; уровень доверия 99%) – для внутрилабораторного контроля качества аналитических работ по оценке содержания примеси IgA методами кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и ИФА.

Выводы. Разработанный ФСО содержания IgA включен в реестр ФСО ГФ РФ под названием «Стандартный образец содержания иммуноглобулинов класса А (IgA)» (реестровый номер ФСО 3.1.00454) и предназначен для стандартизации методов оценки содержания примеси IgA в парентеральных лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека.

Ключевые слова: препараты иммуноглобулинов человека; фармакопейный стандартный образец (ФСО); иммуноглобулины класса А; примесь IgA; аттестация; кинетическая нефелометрия; радиальная иммунодиффузия; иммуноферментный анализ

Для цитирования: Нечаев А.В., Кудашева Э.Ю., Постнова Е.Л., Волкова Р.А., Фадейкина О.В., Борисевич И.В., Мовсесянц А.А. Особенности разработки, аттестации и применения фармакопейного стандартного образца содержания иммуноглобулинов класса А в препаратах иммуноглобулинов человека для парентерального применения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):443–451. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-443-451>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Конфликт интересов. И.В. Борисевич (с 2012 г.) и А.А. Мовсесянц (с 2001 г.) являются членами редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Development, certification, and use of a pharmacopoeial standard for the content of immunoglobulin A in human immunoglobulins for parenteral administration

Alexey V. Nechaev¹✉, Elvira Yu. Kudasheva¹, Evgeniya L. Postnova¹,
Rauza A. Volkova¹, Olga V. Fadeikina¹, Igor V. Borisevich², Artashes A. Movsesyants¹

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

² Federal Medical Biological Agency, 30 Volokolamskoe Hwy, Moscow 123182, Russian Federation

✉ Alexey V. Nechaev; Nechaev@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. The immunoglobulin A (IgA) impurity content in parenteral human immunoglobulins should be determined in accordance with the State Pharmacopoeia of the Russian Federation by kinetic nephelometry, radial immunodiffusion, or enzyme immunoassay (ELISA) with a reference standard. The International Standard (IS) for the content of IgA is certified using gravimetry and radial immunodiffusion. However, neither of the existing standards for the content of IgA in human immunoglobulins is currently certified using all three compendial methods. This prevents analysts from comparing test results obtained by different methods and may lead to an underestimation of the IgA content in human immunoglobulins.

Aim. This study aimed to determine the procedure for the development, certification, and use of a pharmacopoeial reference standard (RS) for the content of IgA in human immunoglobulins.

Materials and methods. The authors studied candidate RSs for the IgA content derived from human plasma for fractionation. The IgA content determination involved kinetic nephelometry, radial immunodiffusion, and ELISA, as well as commercial test kits and the IS. The authors quantified the IgA impurity in samples of commercial human immunoglobulins from various manufacturers. The data analysis involved descriptive statistics and variance analysis using Microsoft Excel and Statistica 10.

Results. The authors established a pharmacopoeial standard with a certified IgA content of 1.98 mg/mL (expanded uncertainty, 0.44 mg/mL; coverage coefficient, $k=2$; confidence level, 95%) for IgA impurity quantification in human immunoglobulins by radial immunodiffusion and ELISA and that of 1.31–2.64 mg/mL (expanded uncertainty, 0.67 mg/mL; coverage ratio, $k=3$; confidence level, 99%) for intralaboratory quality control of IgA impurity quantification by kinetic nephelometry, radial immunodiffusion, and ELISA.

Conclusions. The pharmacopoeial standard developed in the study has been included in the register of standards of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation as the Reference Standard for the Content of Immunoglobulin Class A (IgA) (Registry No. 3.1.00454). The pharmacopoeial standard is intended for the standardisation of analytical methods for the determination of the IgA impurity content in parenteral human immunoglobulins.

Key words: human immunoglobulin preparations; pharmacopoeial standard; immunoglobulin A; IgA impurity; certification; kinetic nephelometry; radial immunodiffusion; enzyme immunoassay; ELISA

For citation: Nechaev A.V., Kudasheva E.Yu., Postnova E.L., Volkova R.A., Fadeikina O.V., Borisevich I.V., Movsesyants A.A. Development, certification, and use of a pharmacopoeial standard for the content of immunoglobulin A in human immunoglobulins for parenteral administration. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3–1):443–451. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-443-451>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

Conflict of interest. I.V. Borisevich has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2012; A.A. Movsesyants has been a member of the Editorial Board of the journal since 2001. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Препараты иммуноглобулинов человека – группа иммунобиологических лекарственных средств, действующим веществом которых являются иммуноглобулины класса G (IgG) человека, выделенные промышленным способом из пула плазмы крови более чем 1000 здоровых доноров. Объединение такого значительно объема субстанции биологического происхождения определяет присутствие в готовых лекарственных формах широкого спектра антител IgG донорской популяции, обеспечивающих заместительный эффект при лечении первичных и вторичных иммунодефицитов. Однако при производстве препаратов иммуноглобулинов существует высокая вероятность выделения, помимо действующего вещества, других белковых компонентов плазмы крови человека, например компонентов фракции иммуноглобулина класса A (IgA).

Присутствие примеси IgA в парентеральных лекарственных формах препаратов иммуноглобулинов человека может стать причиной развития ряда нежелательных реакций со стороны иммунной системы, таких как повышение температуры, озноб, миалгия, артралгия, головная боль, общее недомогание, сыпь, покраснение, зуд, крапивница, анафилактические/анафилактоидные реакции [1]. Для предотвращения возможного развития перечисленных нежелательных реакций необходим контроль препаратов иммуноглобулинов человека по содержанию примеси IgA.

В 2009 г. в странах Европейского союза впервые введены фармакопейные требования

по оценке содержания примеси IgA в препаратах иммуноглобулинов человека для внутривенного и подкожного введения любым пригодным иммунохимическим методом¹. Европейские производители препаратов иммуноглобулинов человека для оценки содержания примеси IgA используют методы радиальной иммунодиффузии, кинетической нефелометрии и иммуноферментного анализа (ИФА).

В 2018 г. в Российской Федерации показатель качества «Имуноглобулин А» был включен в перечень обязательных для оценки качества препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ)². Контроль этого показателя проводится с использованием стандартного образца (СО) количественного содержания IgA с применением фармакопейных методов: кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и ИФА³.

Существенное значение при проведении испытаний препаратов иммуноглобулинов человека по показателям специфической безопасности имеют СО [2]. В 1970 г. в реестр СО Всемирной организации здравоохранения включен международный стандартный образец (МСО) содержания иммуноглобулинов G, A, M⁴. МСО представляет собой лиофилизированную сыворотку крови человека, разлитую в ампулы по 1 мл, аттестованную весовым методом и методом радиальной иммунодиффузии. Установлено, что 1 единица активности IgA в МСО соответствует 14,2 мкг IgA (12,1–16,6 мкг) при до-

¹ 07/2022:0918 Human normal immunoglobulin for intravenous administration. European Pharmacopoeia 11th ed.

07/2022:2788 Human normal immunoglobulin for subcutaneous administration. European Pharmacopoeia 11th ed.

² ФС.3.3.2.0008.15 Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

³ ОФС.1.8.2.0012.18 Количественное определение содержания иммуноглобулинов классов А, М и G в препаратах иммуноглобулинов человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁴ WHO International standard immunoglobulins G, A, M, human serum. NIBSC code: 67/086. <https://nibsc.org/documents/ifu/67-086.pdf>

верительной вероятности 95%; активность IgA составляет 100 единиц на ампулу МСО (1 мл). МСО рекомендовано использовать при определении содержания примеси IgA в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека методом радиальной иммунодиффузии, а также для аттестации вторичных СО. Следует отметить, что МСО не аттестован для количественного определения содержания примеси IgA с использованием методов кинетической нефелометрии и ИФА, широко применяемых отечественными и зарубежными производителями препаратов иммуноглобулинов человека.

Производители препаратов иммуноглобулинов при использовании методов кинетической нефелометрии и ИФА для оценки содержания примеси IgA применяют СО предприятий, аттестованные по отношению к МСО, или контрольные/калибровочные образцы, входящие в состав иммунохимических наборов реактивов/реагентов для определения концентрации IgA в сыворотке/плазме крови и цереброспинальной жидкости человека.

В настоящее время отсутствует национальный СО содержания IgA в препаратах иммуноглобулинов человека, аттестованный в соответствии с тремя фармакопейными методами (метод радиальной иммунодиффузии, метод кинетической нефелометрии и ИФА). Отсутствие единого стандарта не только не позволяет сопоставить результаты, полученные разными методами, но и может стать причиной некорректной оценки содержания нежелательной примеси IgA в препаратах иммуноглобулинов человека.

В период с 2018 по 2022 г. в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России проводились исследования по разработке и аттестации фармакопейного стандартного образца (ФСО) — «Стандартный образец содержания иммуноглобулинов класса А (IgA)».

Цель работы — определить порядок разработки, аттестации и применения фармакопейного стандартного образца (ФСО) содержания IgA в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека.

Материалы и методы

Материалы

Исследуемые образцы кандидата в ФСО содержания IgA изготавливали с использовани-

ем субстанции «Плазма человека для фракционирования», соответствующей требованиям ГФ РФ⁵, в ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» в четыре этапа:

- объединение индивидуальных единиц субстанции «Плазма человека для фракционирования» (не менее 1000 единиц) в производственный пул (загрузку) в соответствии с промышленным регламентом производства иммуноглобулина человека нормального, раствора для внутривенного введения;
- отбор требуемого объема плазмы человека для фракционирования из производственного пула;
- добавление к объему материала для изготовления ФСО 1% раствора CaCl₂ с последующим центрифугированием с целью получения сыворотки крови человека;
- стерилизующая фильтрация в соответствии с промышленным регламентом и розлив сыворотки крови человека в асептических условиях во флаконы для лекарственных средств по 2,0 мл без добавления стабилизаторов и консервантов с последующей укупоркой.

Оборудование

Для проведения аттестации использовали следующее оборудование с действительным на момент испытаний свидетельством о поверке: дозаторы механические одноканальные 100–1000 мкл и 20–200 мкл (Eppendorf AG, Германия); CO₂-инкубатор МСО-15АС (Sanyo Electric Co, Япония); анализатор специфических белков Image 800 (Beckman Coulter, США); анализатор иммунологический Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Финляндия); весы электронные Adventurer AR5120 (OHAUS Corporation, Швейцария); баня водяная ED-19M (Julabo Labortechnik GmbH, Германия); холодильник LKv 3912 (Liebherr-Hausgeraete Lienz, Австрия).

Методы

Аттестацию кандидата в ФСО содержания IgA проводили методами кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии по Манчини и ИФА в соответствии с требованиями ОФС.1.8.2.0012.18⁶. Для аттестации кандидата в ФСО использовали многократное

⁵ ФС.3.3.2.0001.19 Плазма человека для фракционирования. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018 (введена взамен ФС.3.3.2.0001.18 «Плазма человека для фракционирования» приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 185 от 29.03.2019 «Об утверждении общей фармакопейной статьи и фармакопейной статьи»).

⁶ ОФС.1.8.2.0012.18 Количественное определение содержания иммуноглобулинов классов А, М и G в препаратах иммуноглобулинов человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

сравнительное испытание с МСО содержания иммуноглобулинов G, A, M (WHO International Standard Immunoglobulins G, A and M, Human Serum. NIBSC code: 67/086⁷). Установление значений аттестуемой характеристики кандидата в ФСО проводили по результатам, полученным в одной лаборатории с привлечением двух аналитиков (I и II) в течение 10 сут. Аналитики I и II использовали один флакон с кандидатом в ФСО и аликвоту из одной ампулы МСО при проведении аттестации каждым из трех методов.

Аттестуемой характеристикой ФСО являлось содержание IgA, выраженное в мг/мл.

Определение аттестуемой характеристики (содержание IgA) в сериях кандидата в ФСО.

Определение содержания IgA методом кинетической нефелометрии. Для определения содержания IgA использовали диагностические наборы реагентов для кинетической нефелометрии (Beckman Coulter, США). В день проведения аттестации наборы реагентов извлекали из холодильника (2–8 °С) и выдерживали при комнатной температуре не менее 30 мин. Далее готовили по два независимых разведения ФСО и МСО путем добавления к 1 мл ФСО и МСО 9 мл растворителя 1, входящего в состав набора. Последующие этапы метода воспроизводили в соответствии с инструкцией производителя набора реагентов.

Определение содержания IgA методом радиальной иммунодиффузии. Для определения содержания IgA использовали диагностические наборы реагентов для радиальной иммунодиффузии: «Набор реагентов Моно-РИД-G, A, M. Сыворотки диагностические моноспецифические против IgG(H), IgA(H), IgM(H) человека сухие» (АО «НПО «Микроген», Россия). В день проведения аттестации наборы реагентов извлекали из холодильника (2–8 °С) и выдерживали при комнатной температуре не менее 30 мин.

В работе использовали следующие вспомогательные реактивы и реагенты: 0,9 % раствор NaCl (ООО НПП «ПанЭко», Россия); «КлиниТест-ЭФ П Амидо» краситель амидо черный 10Б («ЭКОсервис НПЦ», Россия); «КлиниТест-ЭФ ПР» промывающий раствор для электрофореза («ЭКОсервис НПЦ», Россия); агар (Noble agar, Difco, Vecton Dickinson).

В день проведения аттестации готовили 2% раствор агара. Для этого навеску (2 г) агара вносили в колбу с 100 мл 0,9% раствором NaCl, перемешивали и оставляли для набухания при комнатной температуре на 30 мин, затем помещали колбу на водяную баню и нагревали до полного

расплавления агара и получения прозрачного однородного раствора, не содержащего видимых включений. Далее содержимое ампулы с сывороткой против IgA(H) из набора реагентов растворяли в 1 мл воды и добавляли 0,9% раствор NaCl, доводя концентрацию до уровня, превышающую в 2 раза титр, указанный на ампуле (титр 1:28 – 1 мл антисыворотки и 13 мл раствора 0,9% NaCl). Пробирку с разведенной антисывороткой нагревали на водяной бане при температуре 53±3 °С в течение 30 мин и смешивали с расплавленным агаровым гелем (пробирку с агаром предварительно охлаждали; агар не должен застыть) в равных количествах до получения слоя агара высотой 1 мм (7,5 мл антисыворотки + 7,5 мл агара). Далее содержимое ампулы МСО растворяли в 1 мл воды и готовили в двух повторностях серию последовательных разведений МСО и ФСО в 2, 4 и 8 раз с помощью 0,9% раствора NaCl. Последующие этапы метода воспроизводили в соответствии с инструкцией производителя набора реагентов.

Определение содержания IgA методом иммуноферментного анализа. Для определения содержания IgA использовали диагностические наборы реагентов для иммуноферментного определения концентрации IgA – «IgA общий-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия). В день проведения испытаний наборы реагентов извлекали из холодильника (2–8 °С) и выдерживали при комнатной температуре не менее 30 мин.

В день проведения аттестации проводили подготовку рабочего раствора для разведения сывороток (PPC) и промывочного раствора в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов. Далее готовили в двух повторностях серию последовательных разведений ФСО и МСО: в 1000, 2000, 4000 и 8000 раз (в качестве раствора для разведения использовали PPC, входящий в состав набора реагентов). Затем в лунки 96-луночного планшета вносили по 20 мкл приготовленных разведений ФСО и МСО и по 100 мкл PPC. Последующие этапы метода проводили в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов.

Определение содержания примеси IgA в парентеральных лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека. Определение содержания примеси IgA проводили методами радиальной иммунодиффузии и ИФА с использованием ФСО содержания IgA. В испытании применяли следующие образцы отечественных коммерчески доступных препаратов иммуноглобулинов человека различных производителей:

⁷ <https://nibsc.org/documents/ifu/67-086.pdf>

- № 1 и 2 – образцы препарата иммуноглобулина человека для внутримышечного введения;
- № 3–5 – образцы препарата иммуноглобулина человека для внутривенного введения;
- № 6 и 7 – образцы препарата иммуноглобулина человека для подкожного введения.

Для проведения испытания с использованием метода радиальной иммунодиффузии готовили в двух повторностях три последовательных разведения ФСО в 2, 4, 8 раз с помощью 0,9% раствора NaCl. Проводили подготовку предварительных разведений образцов № 1 и 2 в 10 раз с применением 0,9% раствора NaCl (в трех повторностях). Образцы № 3–7 вносили без предварительного разведения в трех повторностях.

Для проведения испытания с использованием метода ИФА готовили РРС и промывочный раствор в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов для ИФА определения IgA. Далее проводили подготовку серии последовательных разведений ФСО в 1000, 2000, 4000, 8000 раз двух повторностях (в качестве раствора для разведения использовали РРС, входящий в состав набора реагентов). Готовили серию последовательных разведений образцов № 1–7 – в 1000, 2000, 4000, 8000 раз в двух повторностях (в качестве раствора для разведения использовали РРС).

Исследование стабильности ФСО. Исследование стабильности ФСО по показателю «Содержание IgA» проводили методом естественного старения в соответствии с ОФС.1.1.0007.18⁸.

Статистическая обработка результатов. Использовали методы описательной статистики и дисперсионного анализа в программах Microsoft Office Excel (Microsoft, США) и Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США), рассчитывая среднеарифметическое значение (X_{cp}) при $n=60$, стандартное отклонение (S), относительное стандартное отклонение, расширенную неопределенность аттестованного значения (U): для количественного определения ($U=2S$) и для внутрилабораторного контроля качества аналитических работ ($U=3S$). Значимость статистических гипотез проверяли при уровне доверительной вероятности 95% (принятый уровень значимости $p=0,05$) [3]⁹.

В качестве аттестованного значения содержания IgA принимали среднее значение X_{cp} по результатам определения IgA методами ки-

нетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и ИФА ($n=60$).

Результаты и обсуждение

В соответствии с программой аттестации¹⁰ кандидат в ФСО содержания IgA, представляющий собой стерильную сыворотку крови человека во флаконах по 2 мл без консервантов и стабилизаторов, был аттестован фармакопейными методами: кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и ИФА. Результаты аттестации кандидата в ФСО содержания IgA представлены в *таблице 1*.

Результаты проведения статистического анализа при определении содержания IgA двумя аналитиками позволили сделать вывод об отсутствии значимых различий между дисперсиями сравниваемых выборок: значения F -критерия, рассчитанные по экспериментальным данным (1,2 – для метода кинетической нефелометрии; 2,25 – для метода радиальной иммунодиффузии; 1,34 – для метода ИФА), не превышают критическую величину $F_{кр}=4,41$ при уровне значимости $\alpha=0,05$ и числе степеней свободы: внутригрупповом $n=18$, межгрупповом $m=1$. Выявлено отсутствие значимых различий между средними значениями сравниваемых выборок: значения t -критерия, рассчитанные по экспериментальным данным (0,01 – для метода кинетической нефелометрии; 0,22 – для метода радиальной иммунодиффузии; 0,39 – для метода ИФА), не превышают критическую величину $t_{кр}=2,01$ при уровне значимости $\alpha=0,05$ и числе степеней свободы $n=18$.

Учитывая отсутствие статистической значимости различий результатов, полученных двумя операторами, значение аттестованной характеристики рассчитывали с использованием всех полученных данных. Значение аттестованной характеристики ФСО (содержание IgA) составило 1,98 мг/мл. Расширенная неопределенность (U) аттестованного значения ФСО, рассчитанная как $2S$, составила 0,44 мг/мл (коэффициент охвата $k=2$, уровень доверия 95%). ФСО с данной аттестованной характеристикой может быть использован для количественного определения содержания примеси IgA в препаратах иммуноглобулинов человека методами радиальной иммунодиффузии и ИФА [4]. Для метода кинетической нефелометрии ФСО может быть использован только как внутрилабораторный контроль

⁸ ОФС.1.1.0007.18 Стандартные образцы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁹ ГОСТ Р ИСО 21748-2021. Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений.

¹⁰ ОФС.1.1.0007.18 Стандартные образцы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Таблица 1. Результаты аттестации кандидата в фармакопейный стандартный образец содержания IgA методами кинетической нефелометрии (КН), радиальной иммунодиффузии (РИД) и иммуноферментного анализа (ИФА)

Table 1. Certification results for the candidate pharmacopoeial standard for the content of IgA tested by kinetic nephelometry (KN), radial immunodiffusion (RID), and enzyme immunoassay (ELISA)

Статистический параметр <i>Statistical parameter</i>	Результаты статистического анализа при определении содержания IgA методом <i>Statistical analysis results for IgA quantification by</i>					
	КН <i>KN</i>		РИД <i>RID</i>		ИФА <i>ELISA</i>	
	Анали- тик I <i>Analyst I</i>	Анали- тик II <i>Analyst II</i>	Анали- тик I <i>Analyst I</i>	Анали- тик II <i>Analyst II</i>	Анали- тик I <i>Analyst I</i>	Анали- тик II <i>Analyst II</i>
Среднее значение содержания IgA ± стандартное отклонение, мг/мл (n=10) <i>Mean IgA content ± standard deviation, mg/mL (n=10)</i>	2,13±0,12	2,13±0,13	1,96±0,13	1,98±0,19	1,80±0,27	1,85±0,24
Среднее арифметическое значение содержания IgA, мг/мл (n=20) <i>Mean IgA content, mg/mL (n=20)</i>	2,13		1,97		1,82	
Стандартное отклонение, мг/мл (n=20) <i>Standard deviation, mg/mL (n=20)</i>	0,12		0,16		0,25	
Относительное стандартное отклонение, % <i>Relative standard deviation, %</i>	5,63		8,17		13,66	
Критерий Фишера $F_{кр} = 4,41$ при уровне значимости $\alpha = 0,05$, числе степеней свободы: внутрigrupповом $n = 18$, межгрупповом $m = 1$ <i>Fisher's test</i> Reference value, $F_{cr} = 4.41$; significance level, $\alpha = 0.05$; number of degrees of freedom, $n = 18$ (intragroup) and $m = 1$ (intergroup)	Различие статистически незначимо $F = 1,2 < F_{кр}$ <i>Difference is not statistically significant</i> $F = 1.2 < F_{cr}$		Различие статистически незначимо $F = 2,25 < F_{кр}$ <i>Difference is not statistically significant</i> $F = 2.25 < F_{cr}$		Различие статистически незначимо $F = 1,34 < F_{кр}$ <i>Difference is not statistically significant</i> $F = 1.34 < F_{cr}$	
Критерий Стьюдента $t_{кр} = 2,01$ при уровне значимости $\alpha = 0,05$, числе степеней свободы $n = 18$ <i>Student's t-test</i> Reference value, $t_{cr} = 2.01$; significance level, $\alpha = 0.05$; number of degrees of freedom, $n = 18$	Различие статистически незначимо $t = 0,01 < t_{кр}$ <i>Difference is not statistically significant</i> $t = 0.01 < t_{cr}$		Различие статистически незначимо $t = 0,22 < t_{кр}$ <i>Difference is not statistically significant</i> $t = 0.22 < t_{cr}$		Различие статистически незначимо $t = 0,39 < t_{кр}$ <i>Difference is not statistically significant</i> $t = 0.39 < t_{cr}$	
Общее среднее арифметическое значение результатов определения содержания IgA, мг/мл (n=60) Аттестованное значение <i>Total mean IgA content, mg/mL (n=60)</i> <i>Certified value</i>	1,98					
Общее стандартное отклонение, мг/мл (S) (n=60) <i>Total standard deviation, mg/mL (S) (n=60)</i>	0,22					
Относительное стандартное отклонение, % <i>Relative standard deviation, %</i>	11,23					
Расширенная неопределенность значения аттестованной характеристики для количественного определения, $U = 2S$, мг/мл (диапазон аттестованного значения) <i>Expanded uncertainty for the certified parameter for IgA impurity quantification, $U = 2S$, mg/mL (certified value range)</i>	0,44 (1,54–2,42)					
Расширенная неопределенность значения аттестованной характеристики для внутрigrupпового контроля качества аналитических работ, $U = 3S$, мг/мл (диапазон аттестованного значения) <i>Expanded uncertainty for the certified parameter for intralaboratory quality control of IgA impurity quantification, $U = 3S$, mg/mL (certified value range)</i>	0,67 (1,31–2,64)					

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

качества, так как в этом случае исследования проводят с помощью автоматизированных аналитических систем, уже имеющих калибровочную систему и соответствующие статистические программы расчета.

Проведена оценка содержания примеси IgA в образцах лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека для внутримышечного, внутривенного и подкожного введения методами радиальной иммунодиффузии и ИФА с использованием ФСО содержания IgA (табл. 2).

ФСО содержания IgA может быть использован для оценки внутрилабораторного качества аналитических работ при проведении испытаний по оценке содержания примеси IgA в препаратах иммуноглобулинов человека методами кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и иммуноферментного анализа [4]. При этом значение аттестованной характеристики выражают как допустимый диапазон значений – от 1,31 до 2,64 мг/мл (расширенная неопределенность 0,67 мг/мл; коэффициент охвата $k=3$; уровень доверия 99%).

При изучении стабильности трех серий кандидата в ФСО в режиме реального времени методом естественного старения в условиях хранения при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте установлено, что срок годности ФСО содержания IgA составляет 1 год.

По результатам проведенных исследований ФСО содержания IgA включен в реестр ФСО ГФ РФ под названием «Стандартный образец содержания иммуноглобулинов класса А (IgA)» и реестровым номером ФСО 3.1.00454¹¹. ФСО предназначен для стандартизации методов оценки содержания примеси IgA в парентеральных лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека.

Заключение

Разработан и аттестован ФСО 3.1.00454 «Стандартный образец содержания иммуноглобулинов класса А (IgA)», предназначенный для количественного определения содержания примеси

Литература/References

1. Esmaeilzadeh H, Askarisarvestani A, Hosseini N, Samimi S, Shafei A, Mahdavian SA, et al. Adverse reactions in a large cohort of patients with inborn errors of immunity receiving intravenous immunoglobulin. *Clin Immunol*. 2021;230:108826. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2021.108826>
2. Корнилова ОГ, Кривых МА, Волкова РА, Борисевич ИВ. Стандартные образцы в оценке специфической безопасности препаратов иммуно-

Таблица 2. Результаты оценки содержания примеси IgA в образцах парентеральных лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека методами радиальной иммунодиффузии (РИД) и иммуноферментного анализа (ИФА)

Table 2. Results of IgA impurity determination in parenteral human immunoglobulin samples by radial immunodiffusion (RID) and enzyme immunoassay (ELISA)

Номер образца Sample number	Среднее значение содержания IgA ($X_{cp} \pm S$), мг/мл, установленное методом Mean IgA content ($X_{mean} \pm S$), mg/mL, quantified by	
	РИД RID	ИФА ELISA
1	0,423±0,016	0,458±0,013
2	0,455±0,035	0,429±0,022
3	0,423±0,026	0,443±0,014
4	0,423±0,010	0,473±0,022
5	0,422±0,021	0,454±0,013
6	0,428±0,017	0,447±0,015
7	0,443±0,020	0,436±0,022

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

IgA в препаратах иммуноглобулинов человека методами радиальной иммунодиффузии и иммуноферментного анализа, а также для внутрилабораторного контроля качества аналитических работ при проведении испытаний по оценке содержания примеси IgA в препаратах иммуноглобулинов человека методами кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и иммуноферментного анализа.

Результаты проведенных исследований позволили рекомендовать применение разработанного стандартного образца в проекте общей фармакопейной статьи Государственной фармакопеи Российской Федерации «Количественное определение содержания иммуноглобулинов классов G, M и A в препаратах иммуноглобулина человека» (взамен действующей ОФС.1.8.2.0012.18).

глобулинов и альбумина человека: особенности разработки, аттестации и применении. *Стандартные образцы*. 2018;(3–4):33–41.

Kornilova OG, Krivykh MA, Volkova RA, Borisevich IB. Reference materials used for specific safety evaluation of human immunoglobulin and human albumin products: features of development, certification and application. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2018;(3–4):33–41 (In Russ.).

¹¹ <https://www.regmed.ru/produkt-n-service/fso/fso-registry/fso-of-biological-origin/>

<https://doi.org/10.20915/2077-1177-2018-14-3-4-33-41>

3. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика; 1998.
Glantz S. *Primer of biostatistics*. Moscow: Practice; 1998 (In Russ.).
4. Кудашева ЭЮ, Нечаев АВ, Лешина СА, Волкова РА, Клепикова АГ. Композиция для определения со-

держания иммуноглобулинов IgA в лекарственных препаратах. Патент Российской Федерации № 2794887; 2023.

Kudasheva EYu, Nechaev AV, Leshina SA, Volkova RA, Klepikova AG. Composition for determining the content of IgA immunoglobulins in medicinal products. Patent of the Russian Federation No. 2794887; 2023 (In Russ.). EDN: [RUUTJV](https://eprints.ruutjv.ru/)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.В. Нечаев** – экспериментальная работа (проведение испытаний методами кинетической нефелометрии, радиальной иммунодиффузии и иммуноферментного анализа, статистическая обработка результатов), анализ и интерпретация результатов, написание текста рукописи; **Э.Ю. Кудашева, Е.Л. Постнова, О.В. Фадейкина** – дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов, написание текста рукописи; **Р.А. Волкова, И.В. Борисевич** – концепция исследования; **А.А. Movsesyants** – общее руководство работами, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.V. Nechaev** conducted experiments by kinetic nephelometry, radial immunodiffusion, and enzyme immunoassay; performed statistical processing, analysis, and interpretation of the study results; and drafted the manuscript. **E.Yu. Kudasheva, E.L. Postnova, O.V. Fadeikina** designed the study, analysed and interpreted the study results, and drafted the manuscript. **R.A. Volkova, I.V. Borisevich** elaborated the study concept. **A.A. Movsesyants** provided general management and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Нечаев Алексей Викторович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2747-6239>

Nechaev@expmed.ru

Кудашева Эльвира Юрьевна, д-р мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5838-2481>

kudasheva@expmed.ru

Постнова Евгения Леонидовна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1798-4910>

postnova@expmed.ru

Волкова Рауза Асхатовна, д-р биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>

volkova@expmed.ru

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

fadeikina@expmed.ru

Борисевич Игорь Владимирович, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0713-7419>

borisevichiv@fmba.gov.ru

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

movsesyants@expmed.ru

Alexey V. Nechaev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2747-6239>

Nechaev@expmed.ru

Elvira Yu. Kudasheva, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5838-2481>

kudasheva@expmed.ru

Evgeniya L. Postnova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1798-4910>

postnova@expmed.ru

Rauza A. Volkova, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>

volkova@expmed.ru

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

fadeikina@expmed.ru

Igor V. Borisevich, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0713-7419>

borisevichiv@fmba.gov.ru

Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

movsesyants@expmed.ru

Поступила 02.08.2022

После доработки 30.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 2 August 2022

Revised 30 August 2023

Accepted 13 September 2023