



Изучение возможности применения математических методов анализа для оценки специфической активности антител к поверхностному антигену вируса гепатита В в препаратах иммуноглобулинов человека

Е.Л. Постнова[✉], А.А. Мовсисянц

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

✉ Постнова Евгения Леонидовна; postnova@expmed.ru

Резюме

Актуальность. Препараты иммуноглобулинов человека, содержащие в составе антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg), являются средством экстренной профилактики гепатита В у взрослых и детей и применяются для лечения легких и среднетяжелых форм острого вирусного гепатита В. Клиническая эффективность таких препаратов определяется специфической активностью, оцениваемой по содержанию антител к поверхностному антигену вируса гепатита В (anti-HBs антитела), которую в настоящее время определяют с использованием метода иммуноферментного анализа (ИФА).

Цель. Анализ различных математических методов оценки экспериментальных данных, полученных с применением ИФА, для определения активности антител к поверхностному антигену вируса гепатита В в препаратах иммуноглобулинов человека.

Материалы и методы. В работе использовали международный стандартный образец иммуноглобулина человека, содержащий anti-HBs антитела; препараты иммуноглобулинов; набор реагентов для иммуноферментного качественного и количественного определения антител к HBsAg в сыворотке (плазме) крови.

Результаты. С использованием сэндвич-варианта ИФА установлена зависимость получаемого результата определения концентрации anti-HBs антител от выбора способа построения калибровочного графика («ручной» подход, метод параллельных линий с использованием программы «PARALINE», метод линейной регрессии, 4-параметрическая логистическая модель). Разброс полученных значений концентрации anti-HBs антител составил ± 19 МЕ/мл от среднего значения. Установлено, что неверно подобранный метод обработки данных может приводить к ошибочным расчетам значений активности (концентрации) анализируемого вещества в испытуемом образце.

Выводы. Показана необходимость совершенствования математических методов оценки экспериментальных данных, используемых для определения концентрации anti-HBs антител в препаратах иммуноглобулинов человека, и важность перехода от «ручного» к автоматизированному обсчету получаемых результатов (например, с использованием 4-параметрической логистической модели) в соответствии с требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методам испытаний, и с учетом возможностей современного оборудования.

Ключевые слова: препарат иммуноглобулина человека; антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В; anti-HBs антитела; специфическая активность; иммуноферментный анализ; ИФА; математические методы оценки ИФА

Для цитирования: Постнова Е.Л., Мовсесянц А.А. Изучение возможности применения математических методов анализа для оценки специфической активности антител к поверхностному антигену вируса гепатита В в препаратах иммуноглобулинов человека. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3):300–309. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-300-309>

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. А.А. Мовсесянц – член редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2001 г. Е.Л. Постнова заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Possibility of using mathematical analysis methods to evaluate the potency of antibodies to hepatitis B virus surface antigen in human immunoglobulin preparations

Evgeniya L. Postnova ✉, Artashes A. Movsesyants

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

✉ Evgeniya L. Postnova; postnova@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. Anti-hepatitis B virus surface-antigen (HBsAg) immunoglobulins are used to prevent hepatitis B in adults and children after exposure and to treat mild to moderate acute viral hepatitis B. The clinical effectiveness of human immunoglobulin preparations is determined by their potency, which is assessed by the content of antibodies to hepatitis B virus surface antigen (anti-HBs antibodies). Currently, this assessment involves using immunoassay techniques, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Aim. This study examined several mathematical methods for analysing the experimental data obtained in ELISA-based anti-HBs antibody potency assays of human immunoglobulin preparations.

Materials and methods. This study used the international standard for human anti-HBs immunoglobulin, two immunoglobulin preparations, and an ELISA test kit for the detection and quantification of anti-HBs antibodies in serum or plasma samples.

Results. Using sandwich ELISA, the authors ascertained that the measured anti-HBs antibody concentration depended on the choice of calibration curve calculation method (i.e. manual analysis, parallel-line analysis using PARALINE software, linear regression, and 4-parameter logistic regression). The measured anti-HBs antibody concentrations varied by ± 19 IU/mL. According to the study results, an incorrectly selected method of data analysis can lead to an erroneous calculation of the analyte potency (concentration) in the test sample.

Conclusions. The study demonstrated the need for improved mathematical methods for the evaluation of experimental data used to determine the anti-HBs antibody concentration in human immunoglobulin preparations. It is essential to switch from manual to automated calculation (for example, using a 4-parameter logistic model), taking into account the requirements for bioanalytical methods and the capabilities of the available equipment.

Key words: human immunoglobulin preparation; antibodies to hepatitis B virus surface antigen; anti-HBs antibodies; potency; enzyme immunoassay; ELISA; mathematical methods for ELISA data analysis

For citation: Postnova E.L., Movsesyants A.A. Possibility of using mathematical analysis methods to evaluate the potency of antibodies to hepatitis B virus surface antigen in human immunoglobulin preparations. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):300–309. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-300-309>

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. A.A. Movsesyants has been a member of the Editorial Board of the journal since 2001. E.L. Postnova declares no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Вирусные гепатиты представляют серьезную угрозу для общественного здоровья во всем мире. Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в европейском регионе от причин, связанных с вирусными гепатитами, ежегодно умирают около 171 тыс. человек, и смертность в основном вызвана отдаленными последствиями хронических гепатитов В и С. По данным ВОЗ число лиц, живущих с хронической инфекцией, вызванной вирусом гепатита В (ВГВ), составляет более 14 млн человек в Европейском регионе¹. Распространенность хронической инфекции ВГВ широко варьирует: от высокой ($\geq 8\%$, например в Африке, Азии и западной части Тихого океана) до средней (2–7%, например в Южной и Восточной Европе) и низкой ($< 2\%$, например в Западной Европе, Северной Америке и Австралии). Преобладающие пути передачи различаются в зависимости от эндемичности инфекции ВГВ. В регионах с высокой эндемичностью основной путь передачи инфекции перинатальный, тогда как в регионах с низкой эндемичностью преобладающим путем являются половые контакты среди взрослых из группы высокого риска. Считается, что у 25–30% лиц, хронически инфицированных ВГВ, формируется прогрессирующее заболевание печени, включая цирроз и первичный рак печени. Хотя внедрение программ массовой вакцинации позволяет контролировать распространение инфекции ВГВ, основным вариантом лечения для лиц с установленным хроническим заболеванием печени, связанным с ВГВ-инфекцией, является терапевтическое вмешательство. [1].

Препараты иммуноглобулинов человека, содержащие антитела к поверхностному антигену ВГВ (hepatitis B surface antigen, HBsAg), являются лекарственными средствами², показанными для экстренной профилактики гепатита В у взрослых и детей, для лечения легких и среднетяжелых форм острого вирусного гепатита В у взрослых, а также для внутривенного введения при необходимости проведения иммунопрофилактики гепатита В у различных групп населения, в отношении которых имеются подозрения на инфицирование.

Клиническая эффективность препаратов иммуноглобулинов человека определяется специфической активностью, оцениваемой по количественному содержанию антител к HBsAg (anti-HBs антитела). Содержание антител в большинстве случаев определяют с использованием сэндвич-варианта иммуноферментного анализа (сэндвич-ИФА) [2, 3].

Метод ИФА считается одним из наиболее простых в применении, однако ряд биологических и физико-химических факторов может существенно влиять на характер получаемых данных и обуславливать определенные ограничения на применимость подходов к математической обработке результатов [4]. Сэндвич-ИФА используется для определения крупных антигенов, содержащих, по крайней мере, две антигенные детерминанты. При отсутствии лимитирующих факторов в рабочем диапазоне определяемых концентраций должна существовать прямая линейная зависимость между величиной сигнала и концентрацией аналита в пробе. Однако из-за ограниченных количеств антител, сорбированных на твердой фазе, антител, конъюгированных с ферментом, субстрата ферментативной реакции, а также из-за ограниченного рабочего диапазона спектрофотометра реальные калибровочные кривые сэндвич-ИФА могут иметь в разной степени искаженный вид. Зависимость величины регистрируемого сигнала от концентрации аналита при проведении ИФА практически всегда имеет в той или иной степени нелинейный характер [4].

ИФА часто используют с целью определения специфической активности лекарственных средств. Для этого на основании значений оптических плотностей калибровочных проб определяют концентрации аналитов и строят калибровочную кривую, с использованием которой затем и проводят необходимые расчеты. Неверное использование методов математической обработки получаемых данных может привести к ошибочным результатам. В представленной работе проиллюстрирована зависимость получаемого результата определения концентрации anti-HBs антител от выбора того или иного способа построения калибровочного графика

¹ <https://www.who.int/europe/publications/m/item/hepatitis-b-in-the-who-european-region-factsheet-july-2022>

² Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru>

на основе оптических плотностей калибровочных проб.

Цель работы – анализ различных математических методов оценки экспериментальных данных, полученных с применением ИФА, для определения активности anti-HBs антител в препаратах иммуноглобулинов человека.

Материалы и методы

Материалы и оборудование:

- международный стандартный образец иммуноглобулина человека, содержащий anti-HBs антитела (WHO International Standard; Second International Standard for anti-hepatitis B surface antigen (anti-HBs) immunoglobulin, human; NIBSC code: 07/164)³; содержание anti-HBs антител – 100 МЕ/ампула;
- Неогепатект, иммуноглобулин человека против гепатита В («Биотест Фарма ГмбХ», Германия; серия С793111301);
- Иммуноглобулин Сигардис; иммуноглобулин человека нормальный, раствор для инфузий (ООО «Фармацевтическая компания Сычуаньская Юанда Шуянь», Китай; серия 202012005D);
- тест-система «ВектоHBsAg-антитела», набор реагентов для иммуноферментного качественного и количественного определения антител к HBs-антигену вируса гепатита В в сыворотке (плазме) крови (АО «Вектор-Бест», Россия);
- дозаторы механические переменного объема Biohit (Sartorius Biohit, Финляндия);
- термошейкер для планшета ST-3 (Elmi, Латвия);
- фотометр микропланшетный Ledetect96 (Biomed Dr Wieser GmbH, Австрия).

Методы

Иммуноферментный анализ. Постановку ИФА и учет результатов проводили в соответствии с инструкцией по применению тест-системы «ВектоHBsAg-антитела». Оптическую плотность измеряли в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм и референс-фильтр – 620 нм.

Пробоподготовка. Разведение исследуемых образцов препаратов иммуноглобулинов и международного стандарта (калибровочные пробы) готовили в двух повторностях. В качестве разбавителя использовали калибратор с нулевой концентрацией из тест-системы «ВектоHBsAg-антитела». Содержимое каждой пробирки после внесения пробы перемешивали на шейкере в течение 10–15 с. При исследовании использовали разведения образцов иммуноглобулина с концентрацией от 0,1 до 1000 мМЕ/мл.

Обработка результатов эксперимента проводилась с применением следующих подходов:

- по калибровочной кривой с использованием миллиметровой бумаги в соответствии с инструкцией по применению тест-системы «ВектоHBsAg-антитела» («ручной» подход);
- методом параллельных линий с использованием программы «PARALINE» (Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича) на базе программы Microsoft Excel [5];
- по калибровочной кривой при построении графика линейной регрессии;
- с использованием 4-параметрической логистической модели (4PL) с помощью программного обеспечения PLA 2.0.0 (Stegmann Systems, Германия).

Статистическую обработку результатов [6] проводили, рассчитывая среднеарифметическое значение (при $n=3$), среднеквадратическое (стандартное) отклонение (SD), коэффициент вариации (CV) с применением пакета статистических программ Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

При определении концентрации anti-HBs антител методом ИФА для построения калибровочной кривой применяли два подхода: «ручное» построение графика на миллиметровой бумаге и подходы, основанные на использовании компьютерных вычислений или специально разработанного программного обеспечения. Для любого варианта необходимым этапом являлось определение оптической плотности в анализируемых образцах в зависимости от концентрации калибровочных проб.

«Ручной» подход к построению калибровочной кривой

Данный подход остается актуальным, несмотря на широкое распространение компьютерной техники. В соответствии с инструкцией по применению тест-системы «ВектоHBsAg-антитела» калибровочная кривая строится с использованием миллиметровой бумаги. По калибровочному графику определяют концентрацию anti-HBs антител в анализируемом образце. Для этого на оси ординат откладывают средние значения оптической плотности анализируемого образца, по оси абсцисс – концентрацию (активность) калибровочных проб. Параллельно оси абсцисс до пересечения с калибровочным графиком проводят прямую линию. На ось абсцисс опускают

³ <https://www.nibsc.org/documents/ifu/07-164.pdf>

перпендикуляр от точки пересечения калибровочного графика и проведенной прямой. Полученная точка пересечения с осью абсцисс и есть искомое значение концентрации анти-НВс антител в образце, выраженное в мМЕ/мл. Затем проводят пересчет в МЕ/мл.

Результаты оценки специфической активности исследуемых препаратов иммуноглобулинов человека с использованием описанного подхода представлены в *таблице 1*.

Для более точной интерполяции (условие, когда кривая построенной функции должна проходить точно через имеющиеся точки данных) при построении графика вручную необходима в первую очередь линейаризация данных. Недостатками данного подхода являются субъективность при линейаризации графика, отсутствие оценки коэффициента вариации между повторностями анализируемых проб, что, в свою очередь, не позволяет судить о точности и воспроизводимости измерений оптической плотности.

Метод параллельных линий с использованием программы «PARALINE»

Программа «PARALINE» разработана для количественной оценки специфической активности лекарственных средств по отношению к референс-образцам [5]. Используя диспер-

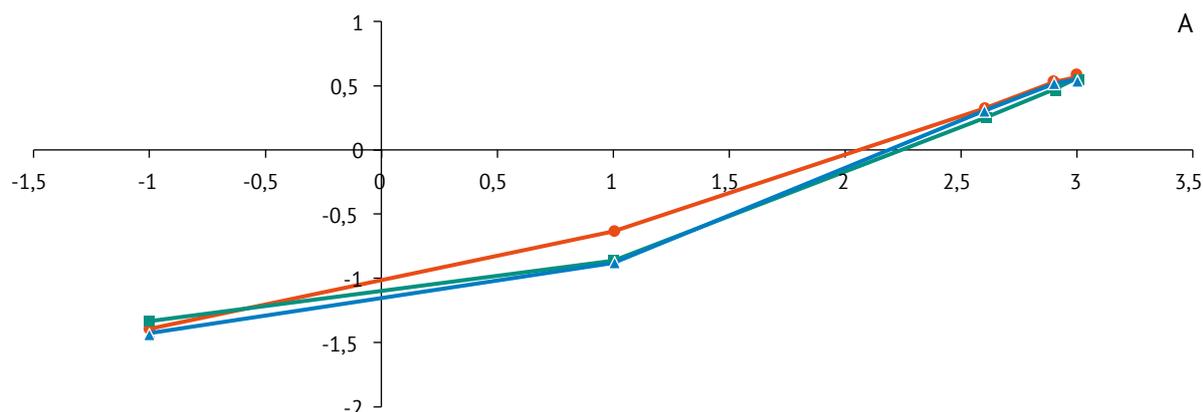
сионный анализ, в программе получают значения специфической активности по отношению к международному стандартному образцу или другому препарату сравнения. Активность иммунобиологических препаратов обычно определяют по сравнению с референс-образцом, активность которого предварительно определена. В качестве референс-образца может выступать как международный стандартный образец, активность которого определена в международных единицах, так и отраслевой стандартный образец, активность которого установлена по международному стандарту. Сравнение проводится таким образом, чтобы можно было определить, какое количество вещества в испытуемом образце обладает такой же активностью, что и стандартный образец. В результате автоматических расчетов в программе «PARALINE» происходит построение графика активности испытуемого образца относительно активности препарата сравнения: по оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации образца, по оси ординат – десятичный логарифм значения оптической плотности. При этом оси абсцисс и ординат выбираются таким образом, чтобы линии, выражающие зависимости для стандартного образца и испытуемого препарата, были прямыми [5].

Таблица 1. Результаты расчета специфической активности препаратов иммуноглобулинов человека с использованием различных математических методов

Table 1. Potency of human immunoglobulin preparations calculated using various mathematical methods

Метод, используемый для построения калибровочной кривой <i>Calibration curve calculation method</i>	Номер измерения <i>Measurement number</i>	Результат определения специфической активности, МЕ/мл <i>Potency calculation result, IU/mL</i>					
		Неогепатект <i>Neohepatect</i>			Иммуноглобулин Сигардис <i>Immunoglobulin Sigardis</i>		
		X	X (n=3)	SD (CV%)	X	X (n=3)	SD (CV%)
«Ручной» подход <i>Manual approach</i>	1	86,2	95,1	7,7 (8,1)	75,0	81,7	5,9 (7,3)
	2	100			83,8		
	3	99			86,3		
Метод параллельных линий с использованием программы «PARALINE» <i>Parallel-line analysis (PARALINE software)</i>	1	74,1	73,5	8,5 (11,5)	75,2	67,8	8,1 (11,9)
	2	81,7			69,0		
	3	64,8			59,2		
Метод линейной регрессии <i>Linear regression</i>	1	86,3	91,1	5,8 (6,3)	71,5	66,0	4,8 (7,2)
	2	89,6			63,2		
	3	97,5			63,3		
4-параметрическая логистическая модель <i>4-parameter logistic model</i>	1	93,8	97,8	4,1 (4,2)	87,2	84,3	2,5 (3,0)
	2	97,5			82,5		
	3	102			83,2		

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



Результаты
Results

Дисперсионный анализ
Analysis of variance

Источник вариации Source of variation	Степень свободы Degree of freedom	Сумма квадратов Sum of squares	Средний квадрат Medium square	F теор. F theoretical	F exper. F experimental	Вывод Conclusion
Измерения (дозы) Measurements (doses)	14	18,4527	1,3180	2,42	15799,06	Значимо Significant
Препараты Preparations	2	0,0271	0,0135	3,68	162,18	Значимо Significant
Линейная регрессия Linear regression	1	17,7350	17,7350	4,54	212583,76	Значимо Significant
Параллелизм Parallelism	2	0,0112	0,0056	3,68	67,19	Да Yes
Линейность Linearity	9	0,6794	0,0755	2,59	904,93	Да Yes
Остаточная ошибка Residual error	15	0,0013	0,0001			
Итого Total	29	18,4539				
	Min	Активность Potency	Max			
Препарат № 1 Неогепафект Preparation 1 Neohepatect	0,67812	0,74126	0,81026			
Препарат № 2 Иммуноглобулин Сигардис Preparation 2 Immunoglobulin Sigardis	0,69072	0,75237	0,81952			

Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Исследование активности образцов иммуноглобулина. А – калибровочный график активности исследуемого образца иммуноглобулина относительно активности международного стандартного образца иммуноглобулина, построенный с использованием программы «PARALINE». По оси Y – десятичный логарифм значений оптической плотности (в двухволновом режиме 450–620 нм), по оси X – десятичный логарифм активности (концентрации anti-HBs антител) исследуемого образца; прямая красного цвета – международный стандартный образец иммуноглобулина человека, содержащий anti-HBs антитела; зеленого цвета – препарат Неогепафект; синего цвета – Иммуноглобулин Сигардис. В – автоматически рассчитанные программой «PARALINE» результаты дисперсионного анализа и активность исследуемых препаратов иммуноглобулинов относительно активности используемого стандартного образца (скриншот).

Fig. 1. Potency of human immunoglobulin samples. A, calibration curves for the potency of the study immunoglobulin preparations and the international standard calculated using PARALINE software. The Y-axis represents \log_{10} absorbance values (dual wavelength mode; 450–620 nm); the X-axis shows \log_{10} potency values (anti-HBs antibody concentrations) for test samples. The red line stands for the international standard for human anti-HBs immunoglobulin; the green one, for Neohепatect; and the blue one, for Immunoglobulin Sigardis. B, variance analysis results automatically calculated in PARALINE software and the potency of the study preparations measured relative to the international standard (screenshot).

Пример построения калибровочного графика определения активности иммуноглобулинов с использованием программы «PARALINE» представлен на *рисунке 1*, результаты оценки активности исследуемых препаратов с использованием программы «PARALINE» – в *таблице 1*.

Для получения конечного значения исследователю необходимо полученный результат умножить на исходную активность препарата сравнения. В случае препарата № 1: $0,74126 \times 100 \text{ МЕ/мл} = 74,126 \text{ МЕ/мл}$ (~74 МЕ/мл). Также программа дает возможность автоматически проводить оценку результатов на соответствие критериям валидности: соблюдение линейности, параллельности, значимости регрессии (*рис. 1В*). В данном случае линейность и параллельность определяются не визуально, а с помощью метода дисперсионного анализа, позволяя также установить доверительные интервалы. Желательным условием проведения испытаний в случае использования программы «PARALINE» является то, что разведения образцов должны быть сделаны независимо друг от друга, то есть из исходного препарата, а не из промежуточного его разведения. Также следует учитывать краевые эффекты, неравномерность распределения теплового поля в термощейкерах, с тем чтобы избежать неидентичности этих факторов [5]. Данный метод позволяет количественно определить активность испытуемого препарата по отношению к стандарту и оценить 95% доверительный интервал.

Построение графика линейной регрессии

Линейная регрессия – это метод анализа, который позволяет смоделировать связь между зависимыми и независимыми переменными путем подбора линейного уравнения к полученным данным. С помощью уравнения можно установить степень влияния независимых величин на зависимую переменную. График линейной регрессии строят с использованием программы Microsoft Excel, в функционале которой имеется достаточно инструментов, предназначенных для проведения подобного вида анализа.

Необходимым условием при построении данной функции является анализ получаемого коэффициента детерминации R^2 . При анализе регрессионных моделей значение коэффициента трактуется как соответствие модели данным. Чем ближе к единице значение R^2 , тем точнее модель соответствует данным. В том случае когда значение R^2 принимает отрицательное значение, можно говорить о неадекватности модели. Данный коэффициент рассматривают как универсальную меру зависимости одной случайной величины

от множества других. Приемлемость модели предполагает, что коэффициент детерминации должен быть не меньше 0,5. Модели, для которых R^2 выше 0,8, считаются приемлемыми (коэффициент корреляции в этом случае превышает 90%). Функциональная зависимость между переменными подтверждается при коэффициенте детерминации равном единице. Результатом расчетов является формула, описывающая функцию полученного графика. Подставляя в формулу значения оптических плотностей анализируемых проб, получают искомые величины специфической активности. Пример построения калибровочного графика определения активности иммуноглобулина с использованием линейной регрессии представлен на *рисунке 2*.

4-параметрическая логистическая модель (4PL)

В настоящее время модель 4PL активно используется для анализа различных показателей качества иммунобиологических препаратов зарубежного производства и считается одной из наиболее корректных. При построении ка-

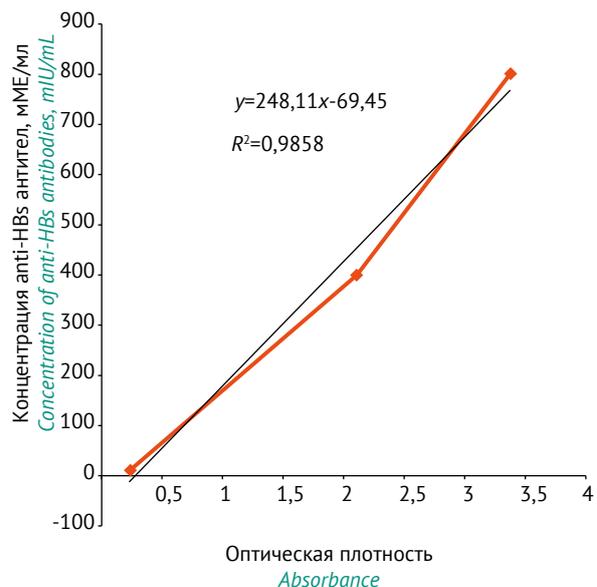


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Калибровочный график активности исследуемого образца иммуноглобулина, построенный с использованием метода линейной регрессии. Кривая оранжевого цвета – график зависимости оптической плотности ($OP_{450-620}$) от используемых концентраций стандартного образца иммуноглобулина; на графике представлена формула регрессионного уравнения и значение R^2 . Прямая черного цвета – регрессионная линия генеральной совокупности.

Fig. 2. Calibration curve for the potency of a test sample calculated by linear regression. The orange line shows absorbance values (450–620 nm) as a function of concentrations of the international standard for human anti-HBs immunoglobulin. The figure includes the regression equation and the R^2 value. The black line is the population regression line.

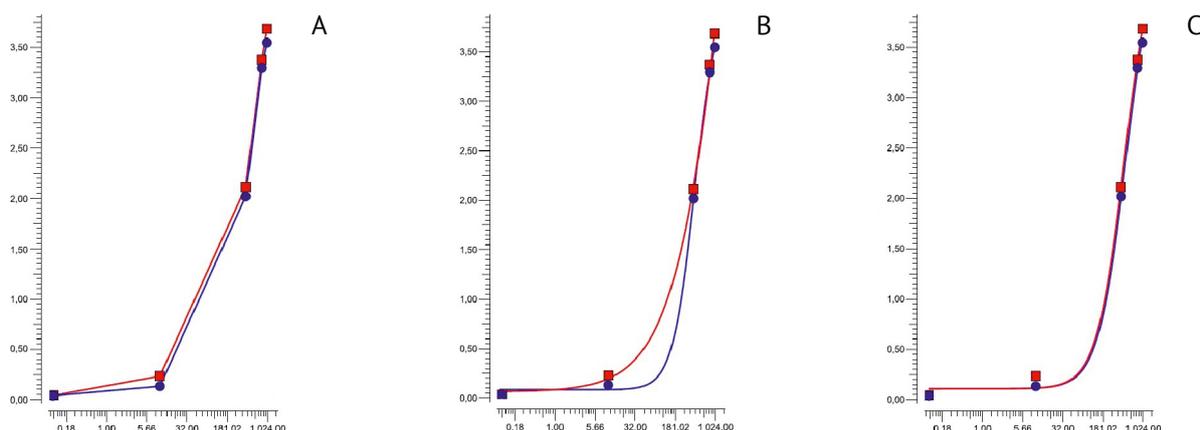


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Калибровочные графики активности исследуемых образцов препаратов иммуноглобулинов, построенные с использованием 4-параметрической логистической модели (4PL). По оси X – активность образца иммуноглобулина, МЕ/мл; по оси Y – значение оптической плотности (в двухволновом режиме 450–620 нм). А – калибровочный график, построенный по средним значениям оптической плотности; В – неограниченная или непараллельная модель, в которой для каждого препарата построена отдельная сигмовидная кривая; С – ограниченная или параллельная модель. Параллельные сигмовидные кривые построены для исследуемых образцов препаратов иммуноглобулинов: кривая красного цвета – препарат Иммуноглобулин Сигардис; кривая синего цвета – препарат Неогепатект.

Fig. 3. Calibration curves for the potency of the study immunoglobulin preparations calculated using a 4-parameter logistic model (4PL). The X -axis represents immunoglobulin potency values, IU/mL; the Y -axis shows absorbance values (dual wavelength mode; 450–620 nm). A, calibration curve calculated using mean absorbance values; B, unconstrained (non-parallel) model with a separate sigmoid curve plotted for each study preparation; C, constrained (parallel) model. Parallel sigmoid curves are plotted for the study immunoglobulin preparations: the red curve stands for Immunoglobulin Sigardis, and the blue one represents Neohepatect.

либровочной кривой в модели 4PL оценивают четыре параметра: средний уровень сигнала для «бесконечной» дозы (фоновый сигнал); средний уровень сигнала для нулевой концентрации аналита; отрезок, отсекаемый прямой на оси Y , и угловой коэффициент прямой [4]. Значением функции в методе логистической регрессии является вероятность того, что исходное значение принадлежит к определенному классу; в методе не производится предсказание значения числовой переменной на основании выборки исходных значений. Программа расчета модели 4PL (PLA 2.0.0) автоматически выдает результат и строит графики. Пример построения калибровочных графиков определения активности иммуноглобулина представлен на рисунке 3. Программа также позволяет вычислять доверительные интервалы.

Результаты оценки специфической активности исследуемых препаратов иммуноглобулинов, полученные с использованием различных подходов (табл. 1), показали, что значения имеют разброс от 64,8 до 102 МЕ/мл для препарата Неогепатект и от 59,2 до 87,2 МЕ/мл для препарата Иммуноглобулин Сигардис; значения коэффициента вариации (относительного стандартного отклонения) не превышают принятый критерий приемлемости (20%), что подтверждает повторяемость методик. Это позволяет сделать вывод о том, что получаемые значения варьируют

в зависимости от выбора метода построения калибровочной кривой. В случае когда производитель представил в требованиях нормативного документа только нижнюю границу специфической активности (например, не менее 0,5 МЕ/мл), а фактическая активность действующего вещества в лекарственном средстве на порядок превышает данные требования, то установленный разброс не будет оказывать влияния на заключение о качестве продукции, но если аналитику необходимо попасть в узкий интервал значений (например, 50–60 МЕ/мл), выбор метода расчета может играть решающую роль. В то же время субъективность «ручного» подхода говорит о необходимости перехода к автоматизированному обсчету получаемых результатов.

Подбор подходящего метода построения калибровочной кривой требует определенно го навыка и поэтому находится, как правило, в компетенции разработчиков ИФА-наборов [4]. Оптимальный для конкретного ИФА-набора метод обсчета результатов с использованием математического анализа данных должен быть описан в инструкции к набору. В тех случаях, когда инструкция такой информации не содержит, оператор вынужден самостоятельно подбирать метод расчета активности (концентрации). Также стоит учитывать, что применяемое при проведении ИФА спектрофотометрическое оборудование предназначено для измерения оптических

плотностей в различных видах исследований, а значит, не все алгоритмы расчетов будут пригодны для обсчета данных именно сэндвич-ИФА. Чем больше возможностей имеет программное обеспечение, тем лучше пользователь должен разбираться в том, какая именно программа подходит к конкретному типу экспериментов. Помимо этого, при подборе следует учитывать, что компьютерные методы обработки данных ИФА могут приводить к некорректному построению калибровочных кривых. Причиной этого может быть ошибочная реализация заложенной в программе последовательности действий.

В соответствии с нормативными документами предприятий на препараты иммуноглобулинов человека как отечественного, так и зарубежного производства, испытания по определению специфической активности, оцениваемой по содержанию anti-HBs антител, проводятся с использованием наборов реагентов, предназначенных для иммуноферментного качественного и количественного определения антител к HBsAg сыворотке (плазме) крови и зарегистрированных на территории Российской Федерации. Инструкции к наборам реагентов не предусматривают проведение оценки результатов с использованием указанных в статье методов, за исключением «ручного» подхода к построению калибровочной кривой. В настоящее время зарубежные производители при разработке иммунобиологических лекарственных средств отказываются от использования готовых наборов для ИФА в пользу разработки методов

in-home [7], тем более что в готовое программное обеспечение, предоставляемое к современным спектрофотометрам, уже заложен анализ различных критериев, позволяющих сделать выводы о точности и валидности получаемых результатов, а также исключена субъективность оценки оператора.

Заключение

Методы автоматизированного обсчета данных иммуноферментного анализа широко используются в мировой практике для оценки специфической активности различных лекарственных средств, в том числе препаратов иммуноглобулинов человека, но не внедрены для оценки специфической активности (концентрации) антител к поверхностному антигену вируса гепатита В в Российской Федерации. Анализ результатов проведенных исследований свидетельствует о необходимости совершенствования математических методов оценки экспериментальных данных, используемых для определения концентрации антител к поверхностному антигену вируса гепатита В в препаратах иммуноглобулинов человека отечественного производства и переходу от «ручного» подхода к автоматизированному обсчету получаемых результатов (например, с использованием 4-параметрической логистической модели) в соответствии с современными требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методам испытаний, и учетом возможностей используемого в настоящее время оборудования.

Литература/References

1. Maddrey WC. Hepatitis B: an important public health issue. *J Med Virol.* 2000;61(3):362–6. [https://doi.org/10.1002/1096-9071\(200007\)61:3%3C362::aid-jmv14%3E3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/1096-9071(200007)61:3%3C362::aid-jmv14%3E3.0.co;2-i)
2. Tabatabaei MS, Ahmed M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol.* 2022;2508:115–34. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2376-3_10
3. Нечаев АВ, Кудашева ЭЮ, Лешина СА, Корнилова ОГ, Коновалова ЕС, Стручкова ИН и др. Теоретическое и экспериментальное обоснование выбора перспективных методов оценки количественного содержания иммуноглобулинов классов G, A и M в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека. *Иммунология.* 2019;40(3):41–50. Nechaev AV, Kudashева EYu, Leshina SA, Kornilova OG, Konovalova ES, Struchkova IN, et al. Theoretical and experimental rationale of the selection of promising methods for quantitative determination of immunoglobulins G, A and M in human immunoglobulin products. *Immunology.* 2019;40(3):41–50 (In Russ.). <https://doi.org/10.24411/0206-4952-2019-13005>
4. Свежова НВ, Шаркова ВЕ, Громов ДБ, Головаченко ВА, Полинцев ДГ. Методы математической обработки данных в иммуноферментном анализе. I. Теоретические основы. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2008;(1):3–9. Svezhova NV, Sharkova VE, Gromov DB, Golovachenko VA, Polyntsev DG. Methods for mathematical data processing in enzyme immunoassay. I. Theoretical bases. *Clinical Laboratory Diagnostics.* 2008;(1):3–9 (In Russ.). EDN: [1ISVNB](https://www.edn.ru/1ISVNB)
5. Петухов ВГ. Метод параллельных линий для количественной оценки качества стандартных образцов и других МИБП в иммуноферментном анализе. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2004;(1):19–23. Petukhov VG. Parallel-line method for quantitative assessment of the quality of standard samples and other MIBPs in enzyme immunoassay. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2004;(1):19–23 (In Russ.).
6. Гланц С. *Медико-биологическая статистика.* М.: Практика; 1998.

Glantz SA. *Primer of biostatistics*. Moscow: Practice; 1998 (In Russ.).

7. Shanmugham R, Thirumeni N, Rao VS, Pitta V, Kas-thuri S, Singanallur NB, et al. Immunocapture en-

zyme-linked immunosorbent assay for assessment of *in vitro* potency of recombinant hepatitis B vaccines. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(8):1252–60. <https://doi.org/10.1128/cvi.00192-10>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.Л. Постнова** – идея и дизайн исследования, проведение экспериментальных исследований, анализ и обобщение экспериментальных данных, написание текста рукописи; **А.А. Мовсесянц** – консультативная помощь в анализе результатов и окончательное утверждение 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. **E.L. Postnova** elaborated the study idea and design, conducted experiments, analysed and summarised experimental data, and drafted the manuscript. **A.A. Movsesyants** provided consultations on the analysis of the study results and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Постнова Евгения Леонидовна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1798-4910>
postnova@expmed.ru

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>
Movsesyants@expmed.ru

Поступила 07.03.2023

После доработки 15.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Evgeniya L. Postnova, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1798-4910>
postnova@expmed.ru

Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>
Movsesyants@expmed.ru

Received 7 March 2023

Revised 15 August 2023

Accepted 13 September 2023