

Аттестация отраслевого стандартного образца содержания антиальфастафилолизина и некоторые аспекты его практического применения

Е. А. Хуснатдинова, Е. С. Коновалова, О. В. Фадейкина, Р. А. Волкова,
Н. И. Кишкурно, Э. Ю. Кудашева, Д. В. Шведов

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

Поступила 06.07.2017 г. Принята к публикации 26.10.2017 г.

Представлены материалы по аттестации кандидата в отраслевой стандартный образец содержания антиальфастафилолизина ОСО 42-28-342-2017, серия № 34, дата выпуска 01.04.2017 г., срок годности до 01.04.2018 г. В соответствии с Программой аттестации стандартного образца в реакции нейтрализации гемолитических свойств токсина стафилококкового экспериментально установлен диапазон значений аттестованной характеристики кандидата в ОСО по отношению к Международному стандартному образцу В03 (21 ± 2 МЕ/мл). ОСО содержания антиальфастафилолизина может быть использован для количественного определения содержания антител к стафилококковому экзотоксину (альфастафилолизину) в реакции нейтрализации гемолитических свойств токсина стафилококкового (альфатоксина) специфическими антителами в плазме крови человека и в ряде групп биологических лекарственных препаратов (иммуноглобулинах человека нормальных и специфических, анатоксинах стафилококковых очищенных и адсорбированных, токсине стафилококковом диагностическом).

Ключевые слова: отраслевой стандартный образец; антиальфастафилолизин; Международный стандартный образец; иммуноглобулин человека; специфическая активность; стафилококковый анатоксин.

Библиографическое описание: Хуснатдинова ЕА, Коновалова ЕС, Фадейкина ОВ, Волкова РА, Кишкурно НИ, Кудашева ЭЮ, Шведов ДВ. Аттестация отраслевого стандартного образца содержания антиальфастафилолизина и некоторые аспекты его практического применения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2017; 17(4): 248–252.

Подтверждение специфической активности основного действующего вещества биологических фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов, получаемых из них, является обязательным требованием при оценке их качества, эффективности и безопасности [1].

Специфическую активность биологических лекарственных препаратов изучают с помощью различных методов количественного определения содержания антигена или другого активного компонента. Показатели специфической активности, критерии и методы их оценки (*in vitro* и/или *in vivo*) зависят от групповой и видовой принадлежности биологического лекарственного препарата.

Обязательным условием при подтверждении специфической активности является использование соответствующих стандартных образцов, откалиброванных по отношению к Международным стандартным образцам (МСО) при их наличии [2, 3].

Количественное определение содержания антител к стафилококковому экзотоксину (альфастафилолизину) в реакции нейтрализации гемолитических свойств токсина стафилококкового (альфатоксина) специфическими антителами рекомендуется для подтверждения специфической активности отдельных видов биологических лекарственных препаратов: иммуноглобулина человека противостафилококкового (показатель «Специфическая активность»), анатоксинов стафилококковых очищенного и очищенного адсорбированного для подкожного введения (показатель «Специфическая активность (иммуногенность)»),

анатоксина стафилококкового очищенного, раствора для подкожного введения (показатель «Антигенная активность»), токсина стафилококкового диагностического (показатель «Лимит гемолитического действия (Lh)») [4, 5].

Для стандартизации методики используют МСО или отраслевой стандартный образец содержания антиальфастафилолизина (ОСО 42-28-342), откалиброванный по отношению к нему [6].

МСО представляет собой лиофилизированную иммунную сыворотку крови лошади, содержащую антитела к антиальфастафилолизину в количестве 220 МЕ в ампуле.

ОСО 42-28-342 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России – глицериновый раствор очищенной концентрированной гипериммунной сыворотки крови лошади, с установленным количественным содержанием антител к альфастафилолизину по сравнению с МСО.

Целью работы является проведение аттестации кандидата в ОСО содержания антиальфастафилолизина в соответствии с современными требованиями и рассмотрение некоторых аспектов его практического применения.

Материалы и методы

Материалы

1. Кандидат в ОСО 42-28-342-2017 — глицериновый раствор очищенной концентрированной гипериммунной сыворотки крови лошади, иммунизированной стафилококковым анатоксином (10 флаконов по 10 мл).

2. Набор реагентов для определения уровня антиальфастифилолизина в сывороточных препаратах крови человека и животных «Токсин стафилококковый диагностический», серия 69, срок годности до 05.18, производитель филиал «Медгамал» ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, соответствует ТУ 9383-001-01894956-2009. Токсин стафилококковый диагностический представляет собой стерильный фильтрат бульонной культуры стафилококка (штамм *Staphylococcus aureus* 0-15).

3. Международный стандартный образец антиальфастифилолизина (WHO International Standard. The 3rd International Standard for Staphylococcus Alpha Antitoxin, Equine. NIBSC code: STA).

4. 15 % взвесь эритроцитов кролика-донора свежеприготовленная.

5. 0,9 % раствор натрия хлорида, ООО «Мосфарм», Россия.

Методы

Содержание антител к антиальфастифилолизину определяли в реакции нейтрализации гемолитических свойств стафилококкового альфатоксина [7].

Расчет математических параметров (среднего значения, стандартного отклонения, доверительного интервала) с доверительной вероятностью 0,95 выполняли по Гланцу [8], с использованием программного обеспечения MS Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Иммунологическая реакция, используемая для определения аттестуемой характеристики отраслевого стандартного образца содержания антиальфастифилолизина, основана на способности специфических антител, присутствующих в ОСО, нейтрализовать гемолитические свойства токсина стафилококкового диагностического.

Установление значения аттестуемой характеристики кандидата в ОСО проводили в лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в соответствии со специально разработанной Программой, определяющей алгоритм ее проведения двумя аналитиками (операторами). Каждый аналитик проводил испытание пяти образцов.

Программа включает два последовательно выполняемых этапа: подготовку к аттестации и экспериментальные исследования аттестуемой характеристики.

Для проведения реакции МСО смешивали в разных разведениях с токсином стафилококковым диагностическим, для индикации реакции в смесь добавляли 15 % взвесь эритроцитов кролика-донора, уровень содержания

антиальфастифилолизина в сыворотке крови которого не превышал 0,125 МЕ/мл. Непосредственно в день проведения аттестации устанавливали лимит гемолитического действия серии используемого токсина (Lh) в опыте. За лимит гемолитического действия токсина принимали минимальное количество стафилококкового токсина, которое, будучи связано с 1 МЕ МСО антиальфастифилолизина, вызывало почти полный гемолиз (+++) эритроцитов кролика, взятых в опыт. Разведения токсина готовили, исходя из значения величины Lh испытуемого стафилококкового токсина, указанного в паспорте производителя (0,14 мл). В ряд пробирок вносили соответствующее количество токсина с интервалом в 0,01 мл с последующим добавлением международного отраслевого стандартного образца антиальфастифилолизина и 15 % суспензии эритроцитов кролика в соответствии со схемой (табл. 1).

По окончании инкубации устанавливали значение лимита гемолитического действия токсина (табл. 2).

Далее готовили рабочие разведения токсина стафилококкового диагностического, общий объем рабочего раствора токсина рассчитывали, исходя из полученного значения Lh.

Точность рабочей дозы токсина оценивали в контрольном ряду с разведением МСО (от 0,12 до 0,08 МЕ/мл), рабочий раствор токсина и 15 % суспензию эритроцитов кролика, внесенными по схеме. Подтверждением правильности использованной рабочей дозы токсина являлся гемолиз 50 % (+ +) эритроцитов крови кролика, который отмечали в пробирке, содержащей 0,1 МЕ МСО (табл. 3).

Значение аттестуемой характеристики кандидата в ОСО определяли, внося необходимые объемы разведений кандидата (мл), рабочих разведений токсина (мл), 15 % взвеси эритроцитов крови кролика (мл) в соответствии со схемой внесения испытуемых образцов, регламентированной статьей Государственной фармакопеи Российской Федерации «Определение содержания антиальфастифилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных» [7].

Полученные результаты аттестации кандидата в ОСО представлены в таблице 4.

Таким образом, диапазон значений аттестованной характеристики кандидата в ОСО содержания антиальфастифилолизина ОСО 42-28-342-2017 [9], серии 34, установленный по отношению к МСО, при проведении исследования двумя операторами, рассчитанный как $X_{cp} \pm 2S_x$, составил 21 ± 2 МЕ/мл.

При соблюдении условий хранения ОСО при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте и транспортирования всеми видами крытого транспорта согласно СП 3.3.2.3332-16 [10] при температуре не выше 8 °С, диапазон значений аттестованной характеристики (21 ± 2 МЕ/мл) ста-

Таблица 1. Схема внесения проб для определения значения лимита гемолитического действия серии используемого токсина (Lh)

Количество токсина, мл	0,11	0,12	0,13	0,14	0,15	0,16	0,17	Контроль эритроцитов
0,9 % раствор натрия хлорида, мл	0,89	0,88	0,87	0,86	0,85	0,84	0,83	2,0
МСО МЕ/мл, мл	1	1	1	1	1	1	1	—
Пробирки встряхивают и выдерживают 15 мин, 18–22 °С								
15 % взвесь эритроцитов	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Пробирки встряхивают и выдерживают 1 ч, 37±1 °С								

Таблица 2. Определение значения лимита гемолитического действия серии используемого токсина (Lh)

Исполнитель (оператор)	Наименование образца	Количество токсина, мл							Контроль эритроцитов
		0,11	0,12	0,13	0,14	0,15	0,16	0,17	
1	1	–	±	±	+	++	+++	++++	–
	2	–	±	+	+	++	++	+++	–
	3	–	+	+	+	++	+++	++++	–
	4	–	–	±	+	+	++	+++	–
	5	±	±	+	++	++	+++	+++	–
2	1	±	+	++	++	+++	+++	++++	–
	2	+	+	++	++	+++	++++	++++	–
	3	–	+	++	++	+++	++++	++++	–
	4	–	±	+	+	++	+++	++++	–
	5	±	+	++	++	+++	+++	++++	–

Примечание. Здесь и в таблице 3: «++++» — полный гемолиз эритроцитов; «+++» — почти полный гемолиз эритроцитов; «++» — частичный гемолиз (50 %); «+» — следы гемолиза эритроцитов; «–» — отсутствие гемолиза эритроцитов.

Таблица 3. Результаты в контрольном ряду

Учет реакции (исполнитель)	Количество антиальфафафилолизина МСО в пробирке, мл					Контроль токсина	Контроль эритроцитов
	0,12	0,11	0,10	0,09	0,08		
Визуальный (1)	–	+	++	++	+++	++++	–
Визуальный (2)	–	+	++	++	+++	++++	–
Фотометрический ($\lambda = 400$ нм) (1)	0,02	0,19	0,354	0,37	0,44	0,591	0,01
Фотометрический ($\lambda = 400$ нм) (2)	0,06	0,25	0,371	0,40	0,46	0,6	0,06

билен в течение установленного срока годности, указанного в паспорте на научно-техническую продукцию — 12 месяцев.

Спектр практического применения ОСО содержания антиальфафафилолизина не ограничен только стандартизацией метода подтверждения специфической активности биологических лекарственных препаратов, предназначенных для профилактики и лечения стафилококковой инфекции.

Таблица 4. Результаты определения значения аттестуемой характеристики кандидата в ОСО содержания антиальфафафилолизина ОСО 42-28-342-2017 (опытный ряд)

Исполнитель (оператор)	Содержание антиальфафафилолизина, МЕ/мл				
	ОСО			МСО	
	Флакон №	x	$x \pm S_x$	x	$x \pm S_x$
1	1	22	$22 \pm 0,4$	22	21 ± 2
	2	22		22	
	3	22		22	
	4	23		23	
	5	22,5		21,5	
2	1	21	$20 \pm 0,5$	21	21 ± 2
	2	20		20	
	3	20		20	
	4	21		21	
	5	20		20	

ОСО содержания антиальфафафилолизина возможно использовать и в производственной и клинической трансфузиологии для оценки эффективности иммунизации доноров стафилококковым анатоксином при получении иммунной противостафилококковой плазмы для переливания или для производства препаратов специфического иммуноглобулина человека.

Для оценки достижения надлежащей степени концентрирования антибактериальных антител в процессе производства препаратов иммуноглобулинов человека (не менее чем в 3 раза при содержании белка в препарате 4,5–5,5 % и не менее чем в 6 раз при содержании белка в препарате 9,0–11,0 %) в качестве индикаторных антител может быть использовано определение содержания антител к стафилококковому экзотоксину в реакции нейтрализации гемолитических свойств стафилококкового альфа-токсина с использованием аттестованного отраслевого стандартного образца.

Выводы

1. Проведена аттестация серии кандидата в ОСО содержания антиальфафафилолизина ОСО 42-28-342-2017 по сравнению с МСО в соответствии с Программой аттестации, разработанной в соответствии с современными требованиями и рекомендациями ВОЗ.

2. Значение аттестуемой характеристики (количественное содержание антиальфафафилолизина) 21 ± 2 МЕ/мл, документация на ОСО оформлена с учетом отечественных требований к стандартным образцам.

3. Диапазон значения аттестованной характеристики (21 ± 2 МЕ/мл) стабилен в течение установленного паспор-

том на научно-техническую продукцию срока годности — 12 месяцев.

Литература

1. Использование иммуноглобулина человека. Доклад Комитета экспертов ВОЗ. ВОЗ, серия технических докладов № 327. Женева, 1968.
2. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Климов ВИ, Саканян ЕИ, Олещук ЮВ, Меркулов ВА и др. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2016; 16(4): 229–36.
3. Миронов АН, Сакаева ИВ, Саканян ЕИ, Бунятян НД, Ковалева ЕЛ, Митькина ЛИ и др. Стандартные образцы в практике зарубежного и отечественного фармацевтического анализа. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения* 2012; (3): 56–60.
4. ФС. 3.3.1.0005.15. Анатоксин стафилококковый очищенный адсорбированный, суспензия для подкожного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 3. М.; 2015. С. 809–16. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
5. ФС. 3.3.1.0006.15. Анатоксин стафилококковый очищенный, раствор для подкожного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 3. М.; 2015. С. 817–25. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
6. *Staphylococcus-alpha antitoxin, equine. Lyophilized, 220 IU. 3rd International Standard. WHO International Biological Reference Preparations.* 2017. P. 21. Available from: <http://www.who.int/bloodproducts/ref materials/>.
7. ОФС. 1.8.2.0008.15. Определение содержания антиальфа-стафилолизина (специфических антител) в лекарственных препаратах из сыворотки крови человека и животных. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2. М.; 2015. С. 949–58. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999.
9. Научно-техническая продукция. Реализация штаммов и отраслевых стандартных образцов ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России. Available from: http://www.regmed.ru/content/page/ EXPERTISE_Strains_Purchase.
10. Постановление Главного государственного врача РФ от 17 февраля 2016 г. № 19 «Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 3.3.2.3332-16 «Условия транспортирования и хранения иммунобиологических лекарственных препаратов».

Об авторах

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

Хуснатдинова Екатерина Александровна. Эксперт 1 категории лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Коновалова Екатерина Сергеевна. Эксперт 2 категории лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Фадейкина Ольга Васильевна. Главный технолог Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Волкова Рауза Асхатовна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р. биол. наук.

Кишкурно Наталья Игоревна. Старший специалист по интеллектуальной собственности отдела редакционно-издательской деятельности и защиты интеллектуальной собственности Центра планирования и координации научно-исследовательских работ

Кудашева Эльвира Юрьевна. Начальник лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Шведов Дмитрий Владимирович. Заместитель начальника Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. мед. наук.

Адрес для переписки: Хуснатдинова Екатерина Александровна, Husnatdinova@expmed.ru

Certification of the branch standard sample of anti-alpha-staphylolysin content, and some aspects of its use

E. A. Khusnatdinova, E. S. Konovalova, O. V. Fadeykina, R. A. Volkova, N. I. Kishkurno, E. Yu. Kudasheva, D. V. Shvedov

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

The article summarises materials on the certification of a candidate branch standard sample (BSS) of anti-alpha-staphylolysin content — OSO 42-28-342-2017 FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, batch No. 34, production date April 1, 2017, expiry date April 1, 2018. According to the Certification programme the reaction of neutralization of staphylococcal toxin hemolytic properties was carried out to establish the range of the certified property of the candidate BSS against the WHO international standard (21 ± 2 IU/ml). The BSS of anti-alpha-staphylolysin content can be used for quantitative determination of antibodies to staphylococcal exotoxin (alpha-staphylolysin) in the reaction of neutralization of staphylococcal toxin (alpha-toxin) hemolytic properties by specific antibodies present in human blood plasma and in a number of biologicals (normal and specific human immunoglobulins, purified and adsorbed staphylococcal toxins, and diagnostic staphylococcal toxin).

Key words: branch standard sample; anti-alpha-staphylolysin; international standard; human immunoglobulin; specific activity; staphylococcal anatoxin.

For citation: Khusnatdinova EA, Konovalova ES, Fadeykina OV, Volkova RA, Kishkurno NI, Kudasheva EYu, Shvedov DV. Certification of the branch standard sample of anti-alpha-staphylolysin content, and some aspects of its use. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(4): 248–252.

References

1. Immunoglobulin for human use. Report of the WHO Expert Committee. WHO, Series of Technical Reports № 327. Geneva, 1968.
2. Volkova RA, Fadeikina OV, Klimov VI, Sakanyan EI, Olefir YuV, Merkulov VA et al. Topical issues related to reference standards in the sphere of circulation of biological products. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(4): 229–36 (in Russian).
3. Mironov AN, Sakaeva IV, Sakanyan EI, Bunyatyan ND, Kovaleva EL, Mitkina LI et al. Reference standards in international and domestic pharmaceutical analysis. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2012; (3): 56–60 (in Russian).
4. FS. 3.3.1.0005.15. Anatoxin staphylococcal purified adsorbed, suspension for subcutaneous administration. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 13th ed. V. 3. P. 809–16. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
5. FS. 3.3.1.0006.15. Staphylococcal anaphylaxis purified, solution for subcutaneous administration. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 13th ed. V. 3. P. 817–25. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
6. *Staphylococcus-alpha antitoxin, equine*. Lyophilized, 220 IU. 3rd International Standard. WHO International Biological Reference Preparations. 2017. P. 21. Available from: <http://www.who.int/bloodproducts/ref materials/>.
7. OFS. 1.8.2.0008.15. Determination of the content of anti-alpha-staphylolysin (specific antibodies) in medicinal preparations from human and animal blood serum. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 13th ed. V. 2. P. 949–58. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
8. Glantz SA. *Primer of Biostatistics*. Moscow: Praktika; 1999 (in Russian).
9. *Scientific and technical products. Realization of strains and industry standard samples of FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia*. Available from: http://www.regmed.ru/content/page/EXPERTISE_Strains_Purchase (in Russian).
10. Decree of the Chief State Doctor of the Russian Federation of February 17, 2016 № 19 «On the approval of sanitary and epidemiological rules SP 3.3.2.3332-16 Conditions for the transport and storage of immunobiological medicinal products» (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation. Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Khusnatdinova EA. 1st professional category expert of the Laboratory of Immunoglobulins and Blood Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Kononova ES. 2nd professional category expert of the Laboratory of Immunoglobulins and Blood Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Fadeykina OV. Chief technologist of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Volkova RA. Head of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Biological Sciences.

Kishkurno NI. Senior intellectual property specialist of the Department for Editorial and Publishing Activities and Intellectual Property Protection of the Centre for Planning and Coordination of Scientific Activities.

Kudashева EYu. Head of the Laboratory of Immunoglobulins and Blood Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Shvedov DV. Deputy head of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Medical Sciences.

Contact e-mail: Khusnatdinova Ekaterina Aleksandrovna, Husnatdinova@expmed.ru