



Разработка стандартного образца предприятия активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток Vero

Е.Г. Абрамова^{1,2,✉}, Ю.К. Гаврилова¹, С.В. Генералов¹, О.А. Лобовикова¹,
И.В. Шульгина¹, А.В. Комиссаров¹, А.К. Никифоров^{1,2}

¹ Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ул. Университетская, д. 46, г. Саратов, 410005, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова», Театральная пл., д. 1, г. Саратов, 410012, Российская Федерация

✉ Абрамова Елена Геннадьевна; abramova.PhD2018@yandex.ru

Резюме

Разработка и применение новых методов контроля качества лекарственных средств предполагает использование большого количества референтного материала для контрольных исследований. Специалистами ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора предложен альтернативный методический подход для определения активности антирабического иммуноглобулина на культуре клеток, внедрение которого в практику диктует необходимость разработки стандартного образца предприятия активности антирабического иммуноглобулина человека Европейской фармакопеи. **Цель работы:** разработка и оценка метрологических характеристик стандартного образца предприятия (СОП) специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток Vero. **Материалы и методы:** иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади; перевиваемая клеточная культура Vero; фиксированный вирус бешенства (штамм Москва 3253_{Vero}); стандартный образец активности антирабического иммуноглобулина человека Европейской фармакопеи. Специфическую активность кандидата в СОП и образцов антирабического иммуноглобулина определяли в реакции нейтрализации на культуре клеток. Учет результатов осуществляли с помощью флуоресцентного микроскопа. Статистическую обработку проводили в соответствии с общей фармакопейной статьей 1.1.0014.15 Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания. **Результаты:** в ходе испытаний установлена аттестуемая характеристика СОП по показателю «Специфическая активность», соответствующая значению 180,8±18,8 МЕ/мл. Граничные значения доверительного интервала определены при уровне вероятности 0,95. Установлен срок годности СОП – 1,5 года при хранении в соответствии с СанПиН 3.3686-21. По итогам аттестации образцу присвоен номер 41-01-20, разработан и утвержден комплект технической и эксплуатационной документации. Применение разработанного СОП позволяет проводить анализ специфической активности антирабического иммуноглобулина *in vitro*, выраженной в международных единицах, для подтверждения соответствия требованиям нормативной документации. **Выводы:** разработан стандартный образец предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации

вируса на клеточной культуре, аттестованный относительно стандартного образца активности антирабического иммуноглобулина человека Европейской фармакопеи.

Ключевые слова: иммуноглобулин антирабический; стандартный образец активности антирабического иммуноглобулина человека Европейской фармакопеи; стандартный образец предприятия; вирус бешенства; реакция нейтрализации; культура клеток

Для цитирования: Абрамова Е.Г., Гаврилова Ю.К., Генералов С.В., Лобовикова О.А., Шульгина И.В., Комиссаров А.В., Никифоров А.К. Разработка стандартного образца предприятия активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток Vero. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(1):38–48. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-38-48>

Development of an in-house reference standard for anti-rabies immunoglobulin potency, to be used in the virus neutralisation test in a Vero cell culture

E.G. Abramova^{1,2,✉}, Yu.K. Gavrilova¹, S.V. Generalov¹, O.A. Lobovikova¹, I.V. Shulgina¹, A.V. Komissarov¹, A.K. Nikiforov^{1,2}

¹ Russian Research Antiplague Institute “Microbe”, 46 Universitetskaya St., Saratov 410005, Russian Federation

² Saratov State Vavilov Agrarian University, 1 Teatrnaya Sq., Saratov 410012, Russian Federation

✉ Elena G. Abramova; abramova.PhD2018@yandex.ru

Resume

The development and use of new methods of quality control of medicines involve the use of a lot of reference materials in quality control testing. Specialists of the Russian Research Antiplague Institute “Microbe” have proposed an alternative methodological approach to determination of potency of anti-rabies immunoglobulin in cell culture, which requires the development of an in-house reference standard (RS) certified against the biological reference preparation (BRP) of the European Pharmacopoeia – human rabies immunoglobulin. **The aim of the study** was to develop and evaluate the metrological characteristics of an in-house RS for anti-rabies immunoglobulin potency, to be used in the virus neutralisation test in a Vero cell culture. **Materials and methods:** the following materials were used in the study: equine rabies immunoglobulin, Vero continuous cell culture, fixed rabies virus (Moscow 3253_{Vero} strain), human rabies immunoglobulin BRP of the European Pharmacopoeia. The potencies of the candidate in-house RS and rabies immunoglobulin samples were determined in the neutralisation test in cell culture. The results were recorded using a fluorescent microscope. Statistical processing was carried out in accordance with general chapter 1.1.0014.15 of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th edition. **Results:** the certified value of the in-house RS potency was 180.8±18.8 IU/mL. The confidence limits were determined at the 0.95 probability level. The shelf life of the in-house RS is 1.5 years (when stored according to the sanitary regulation SanPiN 3.3686-21). The certified in-house RS was assigned with the number 41-01-20. A set of technical and operational documentation was developed and approved for the in-house RS. The developed in-house RS can be used for *in vitro* determination of anti-rabies immunoglobulin potency, expressed in international units, to confirm its compliance with the product specification file. **Conclusions:** the authors developed an in-house RS for anti-rabies immunoglobulin potency, to be used in the virus neutralisation test in cell culture, certified against the human rabies immunoglobulin BRP of the European Pharmacopoeia.

Key words: anti-rabies immunoglobulin; human rabies immunoglobulin BRP of the European Pharmacopoeia; in-house reference standard; rabies virus; neutralisation test; cell culture

For citation:

Abramova E.G., Gavrilova Yu.K., Generalov S.V., Lobovikova O.A., Shulgina I.V., Komissarov A.V., Nikiforov A.K. Development of an in-house reference standard for anti-rabies immunoglobulin potency, to be used in the virus neutralisation test in a Vero cell culture. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):38–48. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-38-48>

Введение

Контроль качества лекарственных препаратов, в том числе иммунобиологических (ИЛП), предусматривает использование стандартных образцов, вопросы разработки которых весьма актуальны в последние десятилетия в связи с повышением требований к качеству лекарственных препаратов, выпускаемых в Российской Федерации [1]. Одним из важнейших показателей качества ИЛП «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади» (АИГ, производство ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора), применяемого для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей при укусах больными или подозрительными на бешенство животными, является специфическая активность [2]. Согласно нормативным документам, значение данного показателя, выраженное в Международных единицах (МЕ), выявляют *in vivo* в реакции нейтрализации (РН) вируса бешенства на белых мышах¹. Ранее в РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора был разработан и аттестован относительно международного стандарта ВОЗ (WHO, 2nd International Standard for anti-rabies immunoglobulin, human) стандартный образец предприятия (СОП) специфической активности, предназначенный для определения активности гетерологичного АИГ в РН на белых мышах при проведении выпускающего контроля качества препарата коммерческих серий [3]. В рамках научно-исследовательских и экспериментальных работ в направлении поиска новых эффективных методов *in vitro* для определения специфической активности АИГ специалистами ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора разработан альтернативный методический подход, суть которого заключается в осуществлении РН вируса бешенства на чувствительной клеточной культуре. Показан высокий уровень корреляции результатов данного теста и традиционной реакции нейтрализации на белых мышах [4].

Предложенный подход представляет собой модификацию метода FAVN (fluorescent antibody virus neutralization test), широко используемого за рубежом в ветеринарной и медицинской практике [5, 6]. К преимуществам использования разработанного теста относится сокращение срока получения результатов с 14 до 3 сут, отсутствие необходимости использования животных, а также возможность одновременного исследования большего количества образцов. Отметим, что метод FAVN рекомендован ВОЗ для оценки протективной активности антирабических лекарственных препаратов². В отечественной практике метод FAVN на сегодняшний день применяют в аккредитованных ветеринарных лабораториях для оценки уровня содержания антител у вакцинированных животных. Разработка и внедрение эффективных экспрессных методов выявления вируснейтрализующих антител в отечественную практику здравоохранения в настоящее время представляется весьма актуальным направлением, требующим развития [7]. Следует отметить, что перспектива внедрения предлагаемого метода определения специфической активности АИГ и антирабических сывороток животных-продуцентов *in vitro* в РН на культуре клеток в производственную практику требует использования большого количества референтного материала для контрольных исследований. Референс-образцом при отработке условий постановки контрольного теста *in vitro* служил стандартный образец активности антирабического иммуноглобулина человека (Human rabies immunoglobulin BRP) Европейской фармакопеи, рекомендованный ВОЗ для определения активности антирабического иммуноглобулина в тесте на культуре клеток. ВОЗ рекомендует использовать первичные международные стандартные образцы для установления значений аттестуемых характеристик вторичных стандартных образцов,

¹ Фармакопейная статья 3.3.1.0038.15 Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.
Фармакопейная статья предприятия ФСР Р N002639/01-250210, изм. № 4 N002639/01-090216 Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций. ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора; 2010.

² Human rabies immunoglobulin, monograph 0723. European Pharmacopoeia 6th ed.; 2013.
Rabies immune globulin. USP 42–NF 36; 2019.
Brazilian Pharmacopoeia 6th ed.; 2019.

а не для рутинных лабораторных исследований³. В связи с этим актуальной является разработка СОП для применения в РН вируса бешенства на культуре клеток, аттестованного по указанному стандартному образцу Европейской фармакопеи. Согласно классификации, стандартным образцом предприятия или рабочим стандартным образцом является стандартный образец, утвержденный руководителем предприятия в установленном порядке и применяемый в соответствии с нормативными документами предприятия [8].

Цель настоящей работы — разработка и оценка метрологических характеристик СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток Vero.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- разработка и аттестация СОП активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток Vero;
- утверждение СОП, разработка технической и эксплуатационной документации (свидетельство, макеты маркировок первичной и вторичной упаковок, инструкция по применению);
- оценка практического применения разработанного СОП.

Материалы и методы

Материалы:

- перевиваемая клеточная линия Vero (клетки почки африканской зеленой мартишки) на уровне 170–180 пассажа из коллекции ООО «Биолот» (Россия), проверенная на отсутствие микоплазм;
- фиксированный вирус бешенства штамм Москва 3253_{Vero}, адаптированный к росту на перевиваемой клеточной культуре Vero; исходный штамм фиксированного вируса бешенства Москва 3253 из коллекции ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, номер депозита 61/91;
- стандартный образец активности антирабического иммуноглобулина человека (Human rabies immunoglobulin BRP) Европейской фармакопеи (batch 1, product code H1100000, European Directorate for the Quality

of Medicines & HealthCare (EDQM) Council of Europe, Strasbourg)⁴ с активностью 91 МЕ/мл (референс-образец);

- иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади (7 образцов);
- диагностический антирабический иммуноглобулин, меченый флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ-АИГ), сухой, для диагностики бешенства животных методом иммунофлуоресценции (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия);
- основные среды и растворы: питательная среда Игла MEM жидкая, с L-глутамином (ООО «Биолот», Россия); раствор Дальбекко (DPBS) без Ca^{2+} и Mg^{2+} (ООО «Биолот», Россия); раствор версена 0,02% (ООО «Биолот», Россия); раствор трипсина 0,25% (ООО «Биолот», Россия); сыворотка крови крупного рогатого скота (КРС) жидкая для культур клеток (ООО «Биолот», Россия);
- система асептическая одноразовая, объем 5 дм³ (Flexboy, Sartorius Stedim Biotech, Германия);
- ампулы стеклянные ШП-2 объемом 2 мл (SCHOTT AG, Германия);
- флаконы культуральные (Orange Scientific, Бельгия);
- планшеты для культивирования клеточных культур, 96-луночные, Greiner bio-one (Cellstar, Германия).

Оборудование

Установка для мойки ампул (BAS, Германия); стерилизатор суховоздушный (ICOS SD-P 602/A, Германия); установка для розлива и запайки ампул (BAS, Германия); установка для определения механических включений (BAS, Германия); установка для определения герметичности ампул (BAS, Германия); бокс микробиологической безопасности (класс биологической безопасности III) БМБ-III-«Ламинар-С»-1,8 (320.180.03) («Ламинарные системы», Россия); инкубатор с углекислой средой (CO_2 -инкубатор) MCO-15AC (Sanyo, Япония); микроскоп инвертированный «Микромед И-Люм» (Россия).

Методы

Реакция нейтрализации вируса бешенства на культуре клеток. Для определения инфицирующей дозы вируса для клеточных культур (ID_{50}) в лунках 96-луночного планшета готовили

³ WHO Expert Committee on biological standardization. Recommendations for the preparation and establishment of international and other biological reference standards. Technical Reports Serie 932. Annex 2. Geneva: WHO; 2004.

⁴ Zwahlen RD. Collaborative study for the establishment of human rabies immunoglobulin Biological Reference Preparation batch no. 1. Pharmeuropa Bio 99-1, 10-18, 1999. https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=H1100000_1 List of european pharmacopoeia reference standards. Effective from 2022/1/31. Catalogue code: H1100000. https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/web_catalog_CRS.pdf

четырёхкратные разведения вирусосодержащей жидкости от $10^{-2,3010}$ до $10^{-6,1544}$, используя в качестве разводящей жидкости питательную среду Игла МЕМ, содержащую от 2 до 5% сыворотки крови КРС для культивирования клеток. В каждую лунку микропланшета вносили равный объем культуры клеток Vero в концентрации $(3,5 \pm 0,5) \times 10^5$ кл/0,1 мл. Микропланшеты с клетками и вирусом выдерживали 72 ч в CO_2 -инкубаторе в атмосфере 5% CO_2 при 37 °С. Далее фиксировали монослой клеток охлажденным раствором ацетона и методом иммунофлуоресценции исследовали клеточную культуру на наличие вируса. Результат учитывали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа при 100–200-кратном увеличении. Инфицированные вирусом клетки имели флуоресцирующую желто-зеленую окраску, оцениваемую на три или четыре балла в соответствии с инструкцией к диагностическому антирабическому иммуноглобулину. При наличии в лунке одной или нескольких флуоресцирующих клеток клеточный монослой считали инфицированным. Титр вируса бешенства рассчитывали методом Reed и Muench⁵.

Постановку реакции нейтрализации вируса бешенства на культуре клеток осуществляли согласно общепринятой методике⁶ в модификации Ю.К. Гавриловой с соавт. [4]. При оценке показателя «Специфическая активность» кандидата в СОП параллельно определяли титр стандартного образца активности антирабического иммуноглобулина человека Европейской фармакопеи (референс-образец). Для этого все образцы (испытываемые и референс-образец) разводили в питательной среде Игла МЕМ с КРС в соотношении 1:50, а затем титровали в лунках 96-луночного планшета с двукратным или трехкратным шагом соответственно по 50 или 100 мкл. Исходя из предварительно рассчитанного значения титра вируса готовили его рабочее разведение. Далее в каждую лунку

микропланшета с исследуемыми образцами вносили равный объем рабочего разведения вируса, при этом инфекционная доза вируса составляла от 100 до 500 ID_{50} /0,05 мл. Планшеты с исследуемыми образцами инкубировали 1 ч при 37 °С, после чего в каждую лунку вносили равный объем культуры клеток Vero в рабочей концентрации. Планшеты с исследуемыми образцами инкубировали 1 ч при 37 °С, после чего монослой клеток фиксировали и окрашивали флуоресцирующими специфическими антителами. При учете результатов отсутствие флуоресцирующих клеток в монослое свидетельствовало о нейтрализации вируса в исследуемом образце. Расчет титра антител осуществляли по методу Reed и Muench⁷. Активность испытуемого образца – кандидата в СОП специфической активности иммуноглобулина антирабического, выраженную в международных единицах (МЕ), рассчитывали по формуле:

$$CA = \frac{A}{B} \times n, \quad (1)$$

где CA – активность СОП (МЕ/мл); A – обратная величина титра СОП; B – обратная величина титра референс-образца; n – активность референс-образца (МЕ/мл).

Для оценки значения специфической активности при аттестации СОП активности антирабического иммуноглобулина использовали среднее арифметическое исследуемой выборки и его доверительный интервал, определяемые в соответствии с общей фармакопейной статьей (ОФС) 1.1.0014.15⁸ с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

Изучение кандидата в СОП по показателям: «Стерильность», «Подлинность», «Пирогенность», «Механические включения», «Извлекаемый объем» проводили согласно нормативным документам⁹.

Для установления срока годности оценивали стабильность СОП активности антирабического иммуноглобулина в долгосрочных испытаниях

⁵ Rupprecht CE, Fooks AR, Abela-Ridder B, eds. Laboratory techniques in rabies. 5th ed. Vol. 1. WHO; 2018.

⁶ Там же.

⁷ Там же.

⁸ Общая фармакопейная статья 1.1.0014.15 Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁹ Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Фармакопейная статья 3.3.1.0038.15 Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.4.2.0003.15 Извлекаемый объем лекарственных форм для парентерального применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.4.2.0005.18 Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

при хранении в условиях, соответствующих требованиям санитарных правил СанПиН 3.3686-21¹⁰.

Результаты и обсуждение

При разработке СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в РН на культуре клеток были учтены требования нормативной документации на гетерологичный антирабический иммуноглобулин¹¹. В качестве кандидата в СОП был выбран специфический иммуноглобулин коммерческой серии 174, биологические и физико-химические показатели которого отвечали требованиям фармакопейной статьи предприятия¹². Кандидат в СОП специфической активности для применения в РН *in vitro* представлял собой специфический иммуноглобулин, выделенный из иммунной сыворотки крови лошади, иммунизированной рабическим антигеном на основе фиксированного вируса бешенства производственного штамма Москва 3253. Для осаждения гамма-глобулина иммунную сыворотку фракционировали риванол-спиртовым методом в соответствии с промышленным регламентом¹³. Приготовление жидкого иммуноглобулина, его очистку и стерилизацию с использованием баромембранных процессов проводили в соответствии с промышленным регламентом¹⁴.

Для изготовления кандидата в СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина очищенный стерильный раствор антирабического иммуноглобулина разливали по 1,3 мл в ампулы объемом 2 мл. Предварительно ампулы обрабатывали автоматически на установке для мойки ампул с использованием воды для инъекций. Вымытые ампулы проверяли визуально на целостность, затем проводили депирогенизацию и стерилизацию ампул при температуре 250 ± 2 °C в течение 1 ч. Розлив стерильного иммуноглобулина из полимерного стерильного апиrogenного контейнера в ампулы по 1,3 мл осуществляли в чистых помещениях, в контролируемых условиях зоны А автоматически с использованием машины для розлива и за-

пайки ампул. Заполненные и запаянные ампулы с препаратом контролировали по следующим показателям: «Подлинность», «Механические включения», «Стерильность», «Пирогенность», «Специфическая активность», «Извлекаемый объем». По результатам испытаний выявлено соответствие качества образцов в первичной упаковке нормируемым требованиям (табл. 1).

Аттестуемой метрологической характеристикой кандидата в СОП являлась специфическая активность в Международных единицах (МЕ/мл). Для решения задачи по аттестации СОП в тесте на культуре клеток определяли специфическую активность трех образцов кандидата в СОП в трех-четыре повторностях, в общей сложности было поставлено 10 реакций нейтрализации вируса бешенства на культуре клеток Vero (табл. 2). В предварительных экспериментах была установлена оптимальная доза вируса бешенства для определения уровня антирабических антител в реакции вируснейтрализации *in vitro*, соответствующая значениям в интервале 100–500 ID₅₀/0,05 мл.

В ходе опытов выявлено, что величина специфической активности, выраженная в МЕ/мл и рассчитанная относительно референс-образца с активностью 91 МЕ/мл, составила от 144 до 227 МЕ/мл. Для оценки аттестованного значения специфической активности СОП использовали среднее арифметическое (\bar{x}) исследуемой выборки. Ошибку среднего арифметического ($\Delta\bar{x}$) рассчитывали по стандартным методикам с использованием критерия Стьюдента. Коэффициент вариации (отношение стандартного отклонения к среднему) в данном случае составил около 13%, что свидетельствовало об однородной совокупности результатов. Аттестованное значение специфической активности составило $180,8 \pm 18,8$ МЕ/мл. Граничные значения доверительного интервала определены при уровне вероятности 0,95.

В таблице 3 представлены результаты испытаний стабильности разработанного СОП специфической активности антирабического

¹⁰ Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4 «Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

¹¹ Фармакопейная статья 3.3.1.0038.15 Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

¹² Фармакопейная статья предприятия ФСР Р N002639/01-250210, изм. № 1 N002639/01-121011, изм. № 2 N002639/01-190613, изм. № 3 N002639/01-240215, изм. № 4 N002639/01-090216, изм. № 5 N002639/01-12112019. Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций. ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора; 2010.

¹³ Промышленный регламент ПР № 01898109-56-19 на производство иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади жидкого, раствора для инъекций. ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора; 2019.

¹⁴ Там же.

Таблица 1. Спецификация кандидата в стандартный образец предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина

Table 1. Specification of the candidate in-house reference standard for rabies immunoglobulin potency

Наименование показателя (с указанием метода) <i>Parameter (test method)</i>	Требования НД <i>Requirements of the product specification file</i>	Результаты испытаний <i>Test results</i>
Подлинность: – видоспецифичность (реакция диффузной преципитации); – специфичность антител (биологический на мышах) <i>Identification:</i> – <i>species specificity (diffusion precipitation test);</i> – <i>antibody specificity (biological test in mice)</i>	Должен соответствовать требованиям НД: – иммуноглобулин должен образовывать четкое кольцо преципитации с сывороткой, преципитирующей белки сыворотки крови лошади, и не образовывать кольцо с сыворотками, преципитирующими белки сыворотки крови человека, крупного рогатого скота и свиньи; – должны присутствовать антирабические антитела <i>The product has to meet the specification requirements:</i> – <i>immunoglobulin forms a distinct precipitation ring with serum precipitating horse serum proteins, and does not form any rings with sera precipitating human, cattle, and pig sera proteins;</i> – <i>rabies antibodies are present</i>	Соответствует <i>The product meets the requirements</i>
Механические включения (визуальный) <i>Particulate matter (visual examination)</i>	Должен выдерживать требования общей фармакопейной статьи 1.4.2.0005.18 <i>The product has to meet the requirements of general chapter 1.4.2.0005.18</i>	Выдерживает требования НД <i>The product meets the specification requirements</i>
Стерильность (метод прямого посева) <i>Sterility (direct inoculation method)</i>	Должен быть стерильным <i>The product is sterile</i>	Стерилен <i>Sterile</i>
Пирогенность (биологический) <i>Pyrogenicity (biological test)</i>	Должен быть апиrogenным <i>The product is apyrogenic</i>	Апиrogenен <i>Apyrogenic</i>
Извлекаемый объем (объемный) <i>Extractable volume (test for extractable volume)</i>	Должен быть не менее номинального <i>At least nominal volume</i>	Соответствует <i>The product meets the requirements</i>

Примечание. НД – нормативная документация.

иммуноглобулина по показателю «Специфическая активность» в течение и конце срока годности (1,5 года), а также через 1 месяц после истечения срока годности. Из этих данных следует, что значение аттестованной характеристики СОП оставалось в пределах установленного при аттестации интервала (табл. 3).

Специфическая активность в тесте на культуре клеток составила соответственно 181,6; 173,7 и 174,3 МЕ/мл, что свидетельствует о стабильности СОП активности антирабического иммуноглобулина в течение срока годности.

Разработанному СОП специфической активности иммуноглобулина антирабического для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток присвоен номер 41-01-20, он внесен в реестр стандартных образцов предприятия, допущенных к применению в экспериментально-производственных подразделениях ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Разработан и утвержден пакет технической и эксплуатационной документации на научно-техническую продукцию СОП 41-01-20 (свидетельство, макеты маркировок первичной и вторичной упаковок, инструкция по применению).

Указанный СОП предназначен для проведения исследований, целью которых является внедрение метода определения специфической активности антирабического иммуноглобулина в РН на культуре клеток в производственную практику.

Апробация разработанного СОП предусматривала исследование специфической активности *in vitro* в РН на культуре клеток Vero образцов антирабического иммуноглобулина различных серий. При расчете по формуле использовали аттестованное значение специфической активности СОП 41-01-20, соответствующее 181 МЕ/мл. Показано, что значения протективного титра антител имели величину от 1:1880 до 1:2700, а рассчитанная относительно разработанного СОП активность в МЕ/мл составила 150–216 МЕ/мл. Полученные результаты продемонстрировали соответствие выявленных значений требованиям нормативной документации на антирабический иммуноглобулин, согласно которой специфическая активность должна соответствовать величине не менее 150 МЕ/мл (табл. 4).

Таким образом, применение разработанного СОП позволяет проводить анализ специфической

Таблица 2. Результаты определения специфической активности кандидатов в стандартный образец предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина в реакции нейтрализации на культуре клеток Vero с использованием стандартного образца Европейской фармакопеи

Table 2. Potencies of the candidate in-house reference standards of anti-rabies immunoglobulin potency obtained in the neutralisation reaction on Vero cell culture using the European Pharmacopoeial biological reference preparation

№ опыта <i>Test number</i>	Образцы кандидата в СОП <i>Candidate in-house RS samples</i>	Титр активности референс-образца <i>RS potency titer</i>	Активность референс-образца в МЕ/мл <i>RS potency (IU/mL)</i>	Титр активности кандидата в СОП <i>Candidate in-house RS potency titer</i>	Активность кандидата в СОП (МЕ/мл) <i>Candidate in-house RS potency (IU/mL)</i>	Аттестованное значение активности кандидата в СОП (МЕ/мл) ($\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$) <i>Certified potency of the candidate in-house RS (IU/mL) ($\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$)</i>
1	Образец 1, опыт 1 <i>Sample 1, test 1</i>	1:5841	91	1:14591	227	180,8±18,8
2				1:9411	147	
3				1:12150	189	
4	Образец 2, опыт 2 <i>Sample 2, test 2</i>	1:1559	91	1:2700	158	
5				1:3394	198	
6				1:3024	177	
7	Образец 3, опыт 3 <i>Sample 3, test 3</i>	1:2016	91	1:4525	204	
8				1:4032	182	
9				1:3200	144	
10				1:4032	182	

Примечание. СОП — стандартный образец предприятия.

Note. RS—reference standard.

Таблица 3. Результаты испытаний стабильности кандидата в стандартный образец предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина в реакции нейтрализации на культуре клеток Vero

Table 3. Results of stability testing of the candidate in-house reference standard of anti-rabies immunoglobulin potency, obtained in the neutralisation test on Vero cell culture

Срок хранения, мес. <i>Shelf life, months</i>	Специфическая активность в реакции нейтрализации на культуре клеток Vero, МЕ/мл <i>Potency in the neutralisation test in the Vero cell culture, IU/mL</i>
0 (на момент выпуска) <i>0 (at the time of release)</i>	180,8±18,8
9 мес. (n = 6) <i>9 months (n = 6)</i>	181,6±30,5
18 мес. (n = 6) <i>18 months (n = 6)</i>	173,7±21,8
19 мес. (n = 6) <i>19 months (n = 6)</i>	174,3±13,3

Примечание. n — объем выборки. Представлены граничные значения доверительного интервала среднего результата (по Стьюденту).

Note. n—sample size. The table gives the confidence limits for the mean value (according to the Student's t-test).

Таблица 4. Специфическая активность антирабического иммуноглобулина в реакции нейтрализации на культуре клеток с применением разработанного стандартного образца предприятия

Table 4. Potencies of anti-rabies immunoglobulin in the neutralisation tests in cell culture using the developed in-house reference standard

Образец АИГ, номер ERIG sample number	Титр антител (активность, МЕ/мл) <i>Antibody titer (potency, IU/mL)</i>			
	реакция нейтрализации № 1 <i>neutralisation test 1</i>	реакция нейтрализации № 2 <i>neutralisation test 2</i>	реакция нейтрализации № 3 <i>neutralisation test 3</i>	используемый стандартный образец предприятия <i>in-house reference standard</i>
1	1:2347 (188)	1:2700 (216)	1:2400 (192)	СОП 41-01-20 1:2263 (181) <i>In-house reference standard</i> 41-01-20 1:2263 (181)
2	1:2263 (181)	1:2091 (167)	1:2138 (171)	
3	1:1880 (150)	1:2248 (180)	1:1905 (152)	
4	1:1903 (152)	1:1872 (150)	1:2043 (163)	

Примечание. АИГ — антирабический иммуноглобулин из сыворотки крови лошади.
Note. ERIG—equine rabies immunoglobulin.

активности антирабического иммуноглобулина *in vitro*, выраженной в международных единицах, для подтверждения соответствия требованиям нормативной документации. Наличие СОП позволит проводить исследования по отработке контрольного теста *in vitro* без использования дорогостоящего стандартного образца активности антирабического иммуноглобулина человека Европейской фармакопеи, что позволит экономить финансовые затраты на обеспечение зарубежными стандартными образцами, а также успешно соблюдать фармацевтическую систему качества на предприятии и соответствовать требованиям отечественных и международных регуляторных органов¹⁵.

По результатам исследований планируется подготовка проекта изменений в фармакопейной статье предприятия «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий» показателя «Специфическая активность».

Выводы

1. Проведена аттестация кандидата в СОП специфической активности антирабического

ского иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток. С применением стандартного образца активности антирабического иммуноглобулина человека Европейской фармакопеи установлена аттестуемая характеристика СОП — специфическая активность в Международных единицах, соответствующая значению 180,8±18,8 МЕ/мл.

2. На основании данных по оценке стабильности СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина установлен срок годности 1,5 года при хранении при температуре от 2 до 8 °С.
3. Разработан и утвержден пакет технической и эксплуатационной документации на научно-техническую продукцию СОП 41-01-20: свидетельство, макеты маркировок первичной и вторичной упаковок, инструкция по применению. СОП внесен в реестр стандартных образцов предприятия, допущенных к применению в экспериментально-производственных подразделениях ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Литература/References

1. Фадейкина ОВ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(8):44–50. [Fadeikina OV, Volkova RA. Elaboration of the certification procedure for biological reference

standards. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2017;51(8):44–50 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-8-44-50>

2. Мовсисянц АА, Бутырский АЮ, Бондарев ВП, Олфир ЮВ, Постнова ЕЛ, Мухачева АВ. К вопросу

¹⁵ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.
Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза. Утв. Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 89.
ICH Q7 Good manufacturing practice for active pharmaceutical ingredients (CPMP/ICH/4106/00). EMA; 2000.

- о применении гетерологичного антирабического иммуноглобулина для специфической профилактики бешенства у людей. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015;5:85–9. [Movsesyants AA, Butyrsky AY, Bondarev VP, Olefir YuV, Postnova EL, Mukhacheva AV. On the issue of the use of heterologous anti-rabies immunoglobulin for the specific prevention of rabies in humans. *Ėpidemiologijā i vakcinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccination Prevention*. 2015;5:85–9 (In Russ.)] <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2015-14-5-85-89>
3. Абрамова ЕГ, Лобовикова ОА, Шульгина ИВ, Комиссаров АВ, Савицкая ЛВ, Генералов СВ и др. Разработка стандартного образца предприятия (СОП) специфической активности иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;4(21):160–4. [Abramova EG, Lobovikova OA, Shulgina IV, Komissarov AB, Savitskaya LV, Generalov SV, et al. Development of quality control sample to assess specific activity of anti-rabies immunoglobulin obtained from equine blood serum. *Razrabotka i registraciā lekarstvennyh sredstv = Drug Development & Registration*. 2017;4(21):160–4 (In Russ.)]
 4. Гаврилова ЮК, Генералов СВ, Абрамова ЕГ, Савицкая ЛВ, Галкина МВ, Кочкин АВ. Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции. *Биотехнология*. 2018;34(4):83–8. [Gavrilova YuK, Generalov SV, Abramova EG, Savitskaya LV, Galkina MV, Kochkin AV. Express analysis of activity of anti-rabies serum and anti-rabies immunoglobulin in cell cultures by immunofluorescence method. *Biotehnologiya = Biotechnology*. 2018;34(4):83–8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2018-34-4-83-88>
 5. Cliquet F, Aubert M, Sagné L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J Immunol Methods*. 1998;212(1):79–87. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(97\)00212-3](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(97)00212-3)
 6. Баркова ИП, Нагиева ФГ, Никулина ВГ, Лисаков АН. Быстрый культуральный метод для индикации антигенов вируса бешенства в инфицированных клеточных культурах. *Инфекция и иммунитет*. 2013;3(4):323–6. [Barkova IP, Nagieva FG, Nikulina VG, Lisakov AN. The rapid culture method for the indication of rabies virus antigens in infected cell cultures. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*. 2013;3(4):323–6 (In Russ.)] <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2013-4-323-326>
 7. Мовсеянц АА, Олефир ЮВ. Современные проблемы вакцинопрофилактики бешенства. *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(1):10–6. [Movsesyants AA, Olefir YuV. Current challenges of preventive vaccination against rabies. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(1):10–6 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-10-16>
 8. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Климов ВИ, Саканян ЕИ, Олефир ЮВ, Меркулов ВА и др. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016;16(4):229–37. [Volkova RA, Fadeikina OV, Klimov VI, Sakanyan EI, Olefir YuV, Merkulov VA, et al. Current issues of standard samples in the field of circulation of biological medicines. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2016;16(4):229–37 (In Russ.)]

Вклад авторов. **Е.Г. Абрамова** – написание текста рукописи, общее руководство исследованиями; **Ю.К. Гаврилова** – сбор и систематизация данных научной литературы, получение экспериментальных данных, оформление и интерпретация результатов; **С.В. Генералов** – получение экспериментальных данных, анализ полученных данных, статистическая обработка данных; **О.А. Лобовикова** – статистическая обработка данных, редактирование рукописи; **И.В. Шульгина** – анализ данных литературы, редактирование рукописи; **А.В. Комиссаров** – получение экспериментальных данных, редактирование рукописи; **А.К. Никифоров** – окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

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

Authors' contributions. **E.G. Abramova**—writing of the text, coordination and management of the study; **Yu.K. Gavrilova**—systematisation of scientific literature, obtaining experimental data, interpretation of the results, formatting of the paper; **S.V. Generalov**—obtaining experimental data, analysis and statistical processing of the obtained results; **O.A. Lobovikova**—statistical processing of the obtained results, editing of the text; **I.V. Shulgina**—literature review, editing of the text; **A.V. Komissarov**—obtaining experimental data, editing of the text; **A.N. Nikiforov**—final approval of the paper for publication.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

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

Об авторах / Authors

Абрамова Елена Геннадьевна, д-р биол. наук. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8798-1547>
abramova.PhD2018@yandex.ru

Гаврилова Юлия Кирилловна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7919-3412>
ylia-93@list.ru

Генералов Сергей Вячеславович, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1461-5383>
svgeneraloff@gmail.com

Лобовикова Оксана Анатольевна, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8085-2331>
Lobovikova_OA@microbe.ru

Шульгина Ирина Витальевна, канд. мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5866-4091>
Shulgina_IV@microbe.ru

Комиссаров Александр Владимирович, д-р биол. наук, проф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1609-0384>
komissarov-9@yandex.ru

Никифоров Алексей Константинович, д-р биол. наук, доц. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1130-3504>
rusrapi@microbe.ru

Elena G. Abramova, Dr. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8798-1547>
abramova.PhD2018@yandex.ru

Yuliya K. Gavrilova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7919-3412>
ylia-93@list.ru

Sergey V. Generalov, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1461-5383>
svgeneraloff@gmail.com

Oksana A. Lobovikova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8085-2331>
Lobovikova_OA@microbe.ru

Irina V. Shulgina, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5866-4091>
Shulgina_IV@microbe.ru

Aleksandr V. Komissarov, Dr. Sci. (Biol.), Professor.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1609-0384>
komissarov-9@yandex.ru

Aleksey K. Nikiforov, Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1130-3504>
rusrapi@microbe.ru

Поступила 28.07.2021

После доработки 03.02.2022

Принята к публикации 11.03.2022

Received 28 July 2021

Revised 3 February 2022

Accepted 11 March 2022