



Разработка критериев приемлемости оценки результатов количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) иммуноферментным методом

Е.В. Шведова^{1,✉}, С.А. Лешина¹, Э.Ю. Кудашева¹, И.В. Борисевич², В.А. Меркулов^{1,3}, Д.В. Шведов¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

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

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

✉ Шведова Евгения Владимировна; NovikovaEV@expmed.ru

Резюме

Метод конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) для количественного определения специфических антител (Ат) — анти-D-Ат IgG, в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) (ИГЧА) основан на конкурентном иммунохимическом связывании между анти-D-Ат в препарате ИГЧА и моноклональными анти-D-Ат к эпитопу D-антигена иммуносорбента — эритроцитов человека фенотипа ccDEE, иммобилизованных на твердой фазе. Приготовление иммуносорбента проводится в условиях лаборатории самостоятельно. При аттестации Международного стандартного образца (МСО) анти-D иммуноглобулина предприняты попытки использования и фенотипа CCDee как наиболее часто встречаемого (16,01%) в сравнении с фенотипом ccDEE (2,16%). Использование фенотипа CCDee возможно при условии соблюдения критериев приемлемости оценки результатов, разработанных при валидации методики. **Цель работы:** разработать критерии приемлемости оценки результатов количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА методом ИФА, в котором для приготовления иммуносорбента, в случае отсутствия эритроцитов фенотипа ccDEE, могут быть использованы эритроциты фенотипа CCDee. **Материалы и методы:** препараты ИГЧА, модельные образцы с известным содержанием анти-D-Ат IgG, МСО анти-D иммуноглобулина, стандартный образец (СО) иммуноглобулина, не содержащий анти-D-Ат IgG, моноклональные анти-D-Ат, эритроциты фенотипов CCDee, ccDEE и ccdee. Определение анти-D-Ат IgG проводили методом конкурентного ИФА. Применяли параметрические и непараметрические методы статистики. **Результаты:** показано, что применение эритроцитов фенотипа CCDee позволяет использовать их для конкурентного иммунохимического связывания с моноклональными анти-D-Ат и анти-D-Ат IgG различных препаратов ИГЧА. Подтверждена пригодность методики с применением фенотипа CCDee по валидационным характеристикам: правильность, промежуточная прецизионность, линейность, селективность, специфичность, устойчивость методики и сопоставимость результатов при использовании эритроцитов фенотипов CCDee и ccDEE.

Разработаны критерии приемлемости: относительные значения содержания анти-D-Ат IgG в испытуемом образце должны быть в интервале $\pm 20\%$ от номинального значения; коэффициент детерминации (R^2) должен быть не менее 0,9; относительное стандартное отклонение (RSD , %) трех значений оптической плотности для каждой концентрации не должно превышать 20%. **Выводы:** разработанные критерии приемлемости гарантируют достоверность получаемых результатов количественного определения анти-D-Ат IgG методом ИФА, что позволяет их использовать специалистами контрольно-аналитических лабораторий для оценки качества препаратов ИГЧА.

Ключевые слова: критерии приемлемости; иммуноферментный анализ; валидация; препараты иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D); количественное определение анти-D-антител IgG; фенотипы эритроцитов; CCDee; ccDEE; иммуносорбент

Для цитирования: Шведова Е.В., Лешина С.А., Кудашева Э.Ю., Борисевич И.В., Меркулов В.А., Шведов Д.В. Разработка критериев приемлемости оценки результатов количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) иммуноферментным методом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(3):266–278. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-266-278>

Development of acceptance criteria for the results of anti-D IgG quantification in human anti-D (Rh₀) immunoglobulin preparations by enzyme immunoassay

E.V. Shvedova^{1,✉}, S.A. Leshina¹, E.Yu. Kudasheva¹, I.V. Borisevich², V.A. Merkulov^{1,3}, D.V. Shvedov¹

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

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

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

✉ Evgeniya V. Shvedova; NovikovaEV@expmed.ru

Abstract

The competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used for the quantification of specific antibodies, anti-D (Rh₀) IgGs, in human anti-D (Rh₀) immunoglobulin preparations relies upon the competition between anti-D antibodies in the preparation and anti-D monoclonal antibodies (mAbs) for immunochemical binding to D-antigen epitopes of the immunosorbent, human erythrocytes of the ccDEE phenotype immobilised on a solid support. The immunosorbent is prepared in-house under laboratory conditions. The certification of the International Standard (IS) for anti-D immunoglobulin included attempts to use the CCDee phenotype, which is more common (16.01%) than the ccDEE phenotype (2.16%). It is possible to use the CCDee phenotype, as long as the user adheres to the acceptance criteria for the results, developed during method validation. **The aim of this study** was to develop the acceptance criteria for the results of anti-D IgG quantification in human anti-D immunoglobulin preparations by the ELISA method that would allow using CCDee erythrocytes to prepare the immunosorbent should there be no erythrocytes of the ccDEE phenotype available. **Materials and methods:** the study used human anti-D immunoglobulin preparations; anti-D IgG-spiked samples; the IS for anti-D immunoglobulin; the reference standard (RS) for anti-D IgG-free immunoglobulin; anti-D mAbs; and erythrocytes of the CCDee, ccDEE, and ccddee phenotypes. The authors quantified anti-D IgG antibodies by the competitive ELISA. The statistical analysis used parametric and nonpar-

ametric tests. **Results:** the study demonstrated the possibility of using CCDee erythrocytes for competitive immunochemical binding with anti-D mAbs and anti-D IgG of various human anti-D immunoglobulin preparations. The suitability of the analytical procedure with the CCDee phenotype was confirmed by validation parameters: trueness, intermediate precision, linearity, selectivity, specificity, and robustness of the method and comparability of the results obtained when using the CCDee and ccDEE phenotypes. The authors developed the acceptance criteria: the relative values of anti-D IgG content in the test sample should range within $\pm 20\%$ of the nominal value; the coefficient of determination (R^2) should be at least 0.9; the relative standard deviation (RSD, %) of three absorbance values for each concentration should not exceed 20%. **Conclusions:** these acceptance criteria guarantee the reliability of assay results of anti-D IgG quantification by the ELISA, which allows them to be used by specialists of control and analytical laboratories to assess the quality of human anti-D immunoglobulin preparations.

Key words: acceptance criteria; enzyme-linked immunosorbent assay; validation; human anti-D (Rh_0) immunoglobulin preparations; anti-D IgG quantification; erythrocyte phenotypes; CCDee; ccDEE; immunosorbent

For citation: Shvedova E.V., Leshina S.A., Kudashева E.Yu., Borisevich I.V., Merkulov V.A., Shvedov D.V. Development of acceptance criteria for the results of anti-D IgG quantification in human anti-D (Rh_0) immunoglobulin preparations by enzyme immunoassay. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* = *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(3):266–278. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-266-278>

Введение

Препараты иммуноглобулина человека антирезус $Rh_0(D)$ (ИГЧА) – единственные иммунобиологические лекарственные средства для специфической перинатальной профилактики резус-иммунизации женщин с резус-отрицательной принадлежностью крови. Они представляют собой концентраты специфических антител (Ат) – анти-D-Ат IgG, полученные из плазмы крови здоровых доноров, иммунизированных D-антигеном резус-положительных эритроцитов человека [1, 2]. Пассивная иммунизация препаратом ИГЧА предотвращает резус-иммунизацию в более чем в 99% случаев при условии достаточности и своевременности дозы введения [3, 4]. Объем вводимых профилактических доз рассчитывают исходя из количественного содержания анти-D-Ат IgG в препарате, выраженного в международных единицах (МЕ) или в микрограммах (мкг) в 1 мл (1 мкг = 5 МЕ) по отношению к Международному стандартному образцу (МСО) анти-D иммуноглобулина или стандартному образцу (СО), откалиброванному по отношению к МСО¹. Метод прямого кон-

курентного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением моноклональных Ат, используемый зарубежными производителями препаратов ИГЧА, является одним из селективных методов для количественной оценки содержания анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА [5, 6].

В соответствии с монографией Европейской фармакопеи² в качестве антигенов (Аг) при приготовлении иммуносорбента в лабораторных условиях для иммуноферментного метода количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА рекомендовано использовать D-положительные эритроциты 0 группы крови человека, полученные не менее чем от 3 доноров, только фенотипа ccDEE³. Критерии приемлемости оценки результатов не представлены⁴.

В связи с трудностью в получении эритроцитов фенотипа ccDEE, связанными с их меньшей распространенностью в популяции, ранее предпринимались попытки использования эритроцитов фенотипа CCDee для самостоятельного приготовления иммуносорбента [7, 8]. Ранее нами были проведены экспериментальные исследо-

¹ Guideline on the clinical investigation of human anti-D immunoglobulin for intravenous and/or intramuscular use (EMA/CPMP/BPWG/575/99, rev. 1). EMA; 2007. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-investigation-human-anti-d-immunoglobulin-intravenous/intramuscular-use_en.pdf

² 2.7.13. Assay of human anti-D immunoglobulin. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2022.

³ Обозначение фенотипов эритроцитов приведено в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации от 22.06.2019 № 797 «Об утверждении Правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов и о признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации».

⁴ 2.7.13. Assay of human anti-D immunoglobulin. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2022.

вания по изучению особенностей иммобилизации эритроцитов человека фенотипов CCDee и ccDEE на твердой фазе [9]. Было установлено, что использование эритроцитов фенотипа CCDee как альтернативного фенотипу ccDEE возможно при условии проведения валидационных исследований, направленных на экспериментальное доказательство пригодности фенотипа CCDee для использования при количественном определении анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА.

Цель работы – разработать критерии приемлемости оценки результатов количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА методом ИФА, в котором для приготовления иммуносorbента, в случае отсутствия эритроцитов фенотипа ccDEE, могут быть использованы эритроциты фенотипа CCDee.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи: 1) установить валидационные параметры в соответствии с международными правилами и требованиями, предъявляемыми к разработке и валидации количественных биоаналитических методик; 2) провести экспериментальные исследования по валидации методики количественного определения анти-D-Ат IgG методом ИФА по характеристикам: правильность, промежуточная прецизионность (повторяемость и внутрилабораторная воспроизводимость), линейность аналитического диапазона, селективность, специфичность, устойчивость методики и сопоставимость результатов при использовании эритроцитов фенотипов CCDee и ccDEE; 3) оценить полученные результаты на соответствие установленным валидационным параметрам.

Материалы и методы

Материалы:

- препараты ИГЧА: лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения, 150 мкг (750 МЕ) с содержанием в 1 мл восстановленного раствора иммуноглобулинов G не менее 90%, глицина 22,5 мг, натрия хлорида 9,0 мг (препарат № 1); раствор для внутривенного введения, 1500 МЕ (300 мкг)/2 мл с содержанием в 1 мл иммуноглобулинов G не менее 95%, глицина 20,6 мг, натрия хлорида не более 0,250 ммоль и альбумина человека 10 мг (препарат № 2);
- эритроциты человека, полученные не менее чем от 3 доноров, фенотипов CCDee, ccDEE

и ccddee (ID-DiaCell I-II-III 5%, ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России) и свежеприготовленные на станции переливания крови (ОБУЗ «Брянская станция переливания крови», Россия);

- СО: МСО анти-D иммуноглобулина (3rd WHO International standard for anti-D Immunoglobulin) с активностью 297 МЕ/ампула (NIBSC code: 16/332, Великобритания)⁵; СО иммуноглобулина человека нормального, не содержащего анти-D-Ат IgG (Y0000540, BRP EDQM, Франция);
- биотинилированные моноклональные анти-D-Ат (Bio-Brad-5, NIBSC code: 02/230, Великобритания);
- конъюгат: авидин/стрептоvidин, конъюгированный с щелочной фосфатазой (Sigma Aldrich, кат. № E2636, США);
- субстрат: паранитрофенил фосфат (Sigma Aldrich, кат. № 7653, США);
- стоп-реагент: 3 М раствор натрия гидроксида (Sigma Aldrich, кат. № 1310-73-2, США);
- твердая фаза: полистироловые прозрачные 96-луночные микропланшеты с максимальной сорбционной емкостью (650 нг белка/см²) (MaxiSorp, Nunc, кат. № 44-2404-21, США);
- реагенты: папаин (Sigma Aldrich, кат. № P4762), глутаровый альдегид (Sigma Aldrich, кат. № G5882), глюкоза (Sigma Aldrich, кат. № G7528), натрия цитрат (Sigma Aldrich, кат. № S4641), L-цистеин (Sigma Aldrich, кат. № 168149), динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (натрия ЭДТА) (Sigma Aldrich, кат. № E4884), кислота борная (Merck, кат. № 1.00165), бычий сывороточный альбумин (BCA) (Sigma Aldrich, кат. № A7030), 1 М раствор хлористоводородной кислоты (Merck, кат. № 1.09871), калия хлорид (Sigma Aldrich, кат. № 746436), натрия хлорид (Sigma Aldrich, кат. № 13423), калия дигидрофосфат (Sigma Aldrich, кат. № P0662), безводный натрия гидрофосфат (Sigma Aldrich, кат. № 53560), трис-(гидроксиметил)аминометан (Sigma Aldrich, кат. № 3362).

Для проведения экспериментальных работ готовили следующие растворы:

- фосфатно-солевой буферный раствор (ФБР) pH 7,4 (8,0 г/л натрия хлорида, 0,76 г/л безводного натрия гидрофосфата, 0,2 г/л калия хлорида, 0,2 г/л калия дигидрофосфата);
- 10% раствор папаина (1 г папаина растворя-

⁵ International collaborative study to calibrate proposed 3rd WHO International standard for anti-D Immunoglobulin. WHO Expert committee on biological standardization (WHO/BS/2018.2332). [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/bs-documents-\(ecbs\)/2019-documents/bs.2018.2332_3rd_is_anti-d.pdf?sfvrsn=46bc283b_5&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/bs-documents-(ecbs)/2019-documents/bs.2018.2332_3rd_is_anti-d.pdf?sfvrsn=46bc283b_5&download=true)

- ли в ФБР pH 5,4, инкубировали в термостате при 37 °C в течение 30 мин, выдерживали после инкубации 15 мин при комнатной температуре, добавляли 1 мл раствора L-цистеина с концентрацией 48,5 мг/мл и 1 мл натрия ЭДТА с концентрацией 3,7 мг/мл и доводили общий объем до 10 мл ФБР pH 5,4);
- ФБР для иммобилизации эритроцитов pH 7,0 (ФБР pH 7,4 с добавлением 18 г/л глюкозы, 10 г/л натрия цитрата, 0,7 г/л натрия ЭДТА);
 - раствор глutarового альдегида (0,5 г/л глutarового альдегида в ФБР pH 7,4);
 - 2% раствор БСА (20 г/л БСА в ФБР pH 7,4);
 - 10% трис-буферный раствор (ТБР) БСА pH 7,2 (8,0 г натрия хлорида, 0,6 г трис(гидроксиметил)аминометана, 1 г БСА).

Методы

Приготовление иммуносорбента. Отбирали 3 мл эритроцитов в пробирку и проводили их трехкратное отмывание от консервантов и остатков компонентов крови путем добавления 10 мл ФБР (pH 7,4) с последующим центрифугированием при 1200 g в течение 3 мин и удалением супернатанта. Далее эритроциты гидролизировали добавлением к 1 объему эритроцитов 1 объема 10% раствора папаина и последующим инкубированием при температуре 37 °C в течение 10 мин. Затем папаинизированные эритроциты отмывали от продуктов гидролиза, как описано выше. С использованием ФБР для иммобилизации эритроцитов (pH 7,0) готовили 0,2% суспензию папаинизированных отмытых эритроцитов, вносили по 50 мкл суспензии в лунки микропланшета и центрифугировали при 120 g в течение 3 мин при температуре 4 °C. Затем в лунки на 10 мин добавляли по 100 мкл раствора глutarового альдегида, после чего промывали трехкратно добавлением 300 мкл ФБР (pH 7,4). Для исключения неспецифического связывания вносили по 250 мкл 2% раствора БСА и выдерживали 30 мин при комнатной температуре.

Приготовление растворов стандартного, модельных (с известным содержанием анти-D-Ат Ig) и испытуемых образцов. Растворы МСО анти-D иммуноглобулина с содержанием анти-D-Ат IgG (30; 15; 7,5; 3,75; 1,88 МЕ/мл) готовили последовательным двукратным разведением с использованием 10% ТБР БСА. Растворы модельных образцов с известным содержанием анти-D-Ат IgG (30; 15; 7,5; 3,75; 1,88 МЕ/мл) для оценки правильности готовили путем добавления растворов МСО в раствор СО иммуноглобулина человека нормального, не содержащего анти-D-Ат IgG. Растворы образцов препаратов ИГЧА

№ 1, 2 разводили до содержания анти-D-Ат IgG 30 МЕ/мл добавлением 24 мл воды очищенной к 1 мл раствора препарата, затем готовили растворы испытуемых образцов с содержанием анти-D-Ат IgG (30; 15; 7,5; 3,75; 1,88 МЕ/мл) путем последовательного двукратного разведения с использованием 10% ТБР БСА.

Прямой конкурентный иммуноферментный метод. Вносили по 35 мкл разведений растворов МСО и разведений испытуемых образцов в лунки планшета для разведения образцов в трех повторностях. К каждому разведению добавляли 35 мкл биотинилированных моноклональных анти-D-Ат. Затем по 50 мкл каждого образца переносили в лунки иммуносорбента. После инкубации в течение 1 ч при температуре 37 °C образованные иммунные комплексы Аг-Ат трехкратно отмывали от несвязавшихся Ат ФБР (pH 7,4). Затем для выявления образованных иммунных комплексов в каждую лунку иммуносорбента вносили 50 мкл конъюгата и проводили инкубацию в течение 30 мин при комнатной температуре. Иммуносорбент трехкратно промывали ФБР (pH 7,4), вносили 100 мкл субстрата и проводили инкубацию в течение 10 мин в темном месте. Реакцию останавливали внесением в лунки иммуносорбента 50 мкл 3 М раствора натрия гидроксида.

Учет результатов. Учет результатов проводили с использованием спектрофотометра (Multiskan Go, ThermoScientific, США) при длине волны 405 нм. Расчеты проводили при построении калибровочного графика зависимости оптической плотности (ОП, относительные единицы (ОЕ)) от концентрации растворов МСО (логарифм значений содержания анти-D-Ат IgG). Содержание анти-D-Ат IgG (МЕ/мл) в испытуемых образцах определяли по формулам (1), (2), (3):

$$C_i = A + B \ln[C_{ct}], \quad (1)$$

$$C_i = K \times \exp\left(\frac{[OП_{и} - A]}{B}\right), \quad (2)$$

$$C_{изм} = \frac{\sum_{i=1}^n C_i}{n}, \quad (3)$$

где C_i – содержание анти-D-Ат IgG, при одном определении, МЕ/мл; $\exp$ – функция для пересчета логарифма при построении линейного графика; A , B – коэффициенты уравнения линейной регрессии калибровочного графика; C_{ct} – содержание анти-D-Ат IgG в растворе МСО, МЕ/мл; $OП_{и}$ – оптическая плотность испытуемого образца, ОЕ; K – коэффициент разведения; $C_{изм}$ – среднее значение содержания анти-D-Ат IgG, рассчитанное по трем определениям, МЕ/мл, n – количество определений.

Для оценки правильности рассчитывали величину степени извлечения (r , %) по формуле (4):

$$r = \frac{C_{\text{изм}}}{C_{\text{теор}}} \times 100\%, \quad (4)$$

где $C_{\text{изм}}$ — среднее значение содержания анти-D-Ат IgG в испытуемом образце, рассчитанное по 3 определениям, МЕ/мл; $C_{\text{теор}}$ — за теоретическое значение принимали количество анти-D-Ат IgG в МСО, добавленных в раствор СО иммуноглобулина человека нормального, не содержащего анти-D-Ат IgG. Для расчета содержания анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА использовали лицензионную программу статистической обработки результатов ИФА методом параллельных линий⁶.

Статистическая обработка результатов.

Данные обрабатывали с использованием пакета программ IBM SPSS Statistics версии 20 (Microsoft Windows, США). Рассчитывали среднее арифметическое значение, стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение RSD (%). Коэффициент детерминации (R^2) линейной регрессии определяли при построении логарифмического калибровочного графика зависимости ОП от концентрации растворов МСО, доверительный интервал рассчитывали как произведение SD и количества значений в группе данных при $p=0,05$, значимость различий данных оценивали с помощью t -критерия Стьюдента и U -критерия Манна–Уитни для независимых выборок [10].

Результаты и обсуждение

Процедура валидации, валидационные характеристики методики количественного определения анти-D-Ат IgG и критерии приемлемости для оценки валидационных характеристик были определены в соответствии с требованиями и рекомендациями нормативных документов международных регуляторных органов (ICH, ЕАЭС, FDA, EMA), предъявляемыми к разработке и валидации количественных биоаналитических методов, основанных на образовании иммунных комплексов Аг–Ат⁷. Установленные для валидации параметры представлены в таблице 1.

Оценку правильности (точности) количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА с использованием эритроцитов фенотипа CCDee проводили с использованием МСО и модельных смесей с известным содержанием определяемого вещества (табл. 2). Рассчитывали средние значения степени извлечения (r , %) анти-D-Ат IgG в испытуемых растворах для каждой концентрации, а затем среднее значение для пяти испытуемых растворов. Оценивали результат отклонением среднего результата определений ($C_{\text{изм}}$) от значения, принимаемого за истинное ($C_{\text{теор}}$).

Во всех испытаниях получены удовлетворительные результаты — значения, принимаемые за истинные ($C_{\text{теор}}$), лежат внутри доверительного интервала соответствующих средних результатов испытаний, полученных экспериментально данной методикой. Результаты оценки содержания анти-D-Ат IgG в испытуемых образцах соответствуют установленному критерию приемлемости ($\pm 20\%$).

Оценку промежуточной прецизионности (внутрилабораторной воспроизводимости и повторяемости) количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА с использованием эритроцитов фенотипа CCDee проводили в разные дни два аналитика (табл. 3). Проводили по 6 испытаний на препаратах ИГЧА № 1, 2 с одинаковым содержанием анти-D-Ат IgG в 1 мл — 750 МЕ. Общее количество испытаний — 12.

Прецизионность подтверждалась соответствием полученных результатов установленным критериям приемлемости: величина RSD (%) значений содержания анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА, полученных на 6 образцах каждым аналитиком, составила менее 20% (3,54 и 8,89%); величина RSD (%) значений содержания анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА, полученных на 12 образцах, составила менее 20% (6,48%); значения содержания анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА, определенные каждым аналитиком (аналитик 1 — от 729,15 до 771,65 МЕ/мл, аналитик 2 — от 685,01 до 789,99 МЕ/мл), находятся в диапазоне $\pm 20\%$, или от 600 до 900 МЕ/мл от номинального значения (750 МЕ/мл), что соответствует

⁶ PLA Database version 2.0.0 (build 551), S/N: 10536.

⁷ Руководства ICH для фармацевтической отрасли. Качество: практическое руководство. Береговых ВВ., ред. Санкт-Петербург: Профессия; 2017.

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 (ред. от 04.09.2020) «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Приложение № 6. Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов.

Bioanalytical method validation: guidance for industry. FDA; 2018. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>

Guideline on bioanalytical method validation (EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev.1 Corr.2). EMA; 2011. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf

Таблица 1. Установленные валидационные параметры методики количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) методом иммуноферментного анализа**Table 1.** Established validation parameters of the enzyme immunoassay for quantitative determination of anti-D IgG antibodies in human anti-D (Rh₀) immunoglobulin preparations

Валидационная характеристика <i>Validation parameter</i>	Критерии приемлемости <i>Acceptance criteria</i>
Правильность (точность) <i>Trueness (accuracy)</i>	Степень извлечения (r , %) анти-D-Ат IgG в модельных образцах, приготовленных путем добавления раствора МСО в раствор СО иммуноглобулина человека нормального, не содержащего анти-D-Ат IgG, должна находиться в диапазоне $\pm 20\%$ относительно добавленного количества ($C_{\text{теор}}$) <i>Recovery (r, %) of anti-D IgG from the samples prepared by spiking the solution of the anti-D IgG-free RS of normal human immunoglobulin with the IS solution should range within $\pm 20\%$ of the spiked amount (C_{theor})</i>
Промежуточная прецизионность (внутрилабораторная воспроизводимость и повторяемость) <i>Intermediate precision (intra-laboratory reproducibility and repeatability)</i>	1. Величина RSD (%) значений содержания анти-D-Ат IgG, полученных на 12 образцах двумя аналитиками в разные дни (по 3 образца препаратов ИГЧА № 1, 2 каждым аналитиком в 3 дня) должна быть $\leq 20\%$. 2. Содержание анти-D-Ат IgG в испытуемых образцах препаратов ИГЧА № 1, 2, определенное каждым аналитиком, должно находиться в диапазоне $\pm 20\%$ от номинального значения <i>1. Relative standard deviation (RSD, %) of the values of anti-D IgG content obtained for 12 samples by two analysts on different days (3 samples of human anti-D immunoglobulin preparations Nos. 1 and 2 each within 3 days) should be $\leq 20\%$. 2. Anti-D IgG content in the test samples of human anti-D immunoglobulin preparations Nos. 1 and 2, determined by each of the analysts, should range within $\pm 20\%$ of the nominal value</i>
Линейность аналитического диапазона <i>Linearity (analytical range)</i>	Графики зависимости значений оптической плотности от содержания анти-D-Ат IgG в растворах МСО визуально должны характеризоваться линейностью в диапазоне от 1,8 до 30 МЕ/мл, коэффициенты детерминации (R^2) линейной регрессии должны быть $\geq 0,9$ <i>Plots of absorbance versus anti-D IgG content in IS solutions should be visually linear in the range from 1.8 to 30 IU/mL; coefficients of determination (R^2) of the linear regression should be ≥ 0.9</i>
Селективность и специфичность <i>Selectivity and specificity</i>	1. Содержание анти-D-Ат IgG в испытуемых образцах препаратов ИГЧА № 1, 2 содержащих глицин, натрия хлорид, альбумин человека, должно находиться в диапазоне $\pm 20\%$ от номинального значения. 2. Конкуренция между компонентами реакции: СО иммуноглобулина человека нормального, не содержащего анти-D-Ат IgG, и моноклональными анти-D-Ат при их внесении в лунки иммуносорбента, приготовленного с использованием эритроцитов фенотипа CCDee, должна отсутствовать. 3. Внесение растворов МСО и испытуемых образцов в лунки иммуносорбента, приготовленного с использованием эритроцитов резус-отрицательного фенотипа ccdee, не должно образовывать комплекса Ag-Ат <i>1. Anti-D IgG content in the test samples of human anti-D immunoglobulin preparations Nos. 1 and 2 containing glycine, sodium chloride, and human albumin should range within $\pm 20\%$ of the nominal value. 2. Reaction components, the anti-D IgG-free RS of normal immunoglobulin and the anti-D mAbs, should not compete with each other when introduced into the wells with the immunosorbent prepared using CCDee erythrocytes. 3. Antigen-antibody complexes should not form when IS solutions and test samples are introduced into the wells with the immunosorbent prepared using Rh-negative ccdee erythrocytes</i>
Устойчивость методики, сопоставимость результатов при использовании эритроцитов фенотипов CCDee и ccDEE <i>Robustness of the analytical procedure, comparability of the results obtained with CCDee and ccDEE erythrocytes</i>	Значимость различий данных при оценке независимых выборок с помощью t -критерия Стьюдента и U -критерия Манна-Уитни количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА № 1, 2, полученных в условиях оценки промежуточной прецизионности с использованием эритроцитов фенотипов CCDee и ccDEE, должна отсутствовать <i>With independent sample Student's t- and Mann-Whitney U-tests, no significant difference should be observed between the results of anti-D IgG quantification in human anti-D immunoglobulin preparations Nos. 1 and 2 obtained under the conditions for the evaluation of intermediate precision using CCDee and ccDEE erythrocytes</i>

Примечание. Ат — антитела, Ag — антигены, ИГЧА — иммуноглобулин человека антирезус Rh₀(D), СО — стандартный образец, МСО — международный стандартный образец, r — степень извлечения анти-D-Ат IgG в испытуемых образцах, $C_{\text{теор}}$ — значения содержания анти-D-Ат IgG, принимаемые за истинные, RSD — относительное стандартное отклонение, R^2 — коэффициент детерминации.

Note. mAb—monoclonal antibody, RS—reference standard, IS—international standard, r —recovery of anti-D IgG from the test samples, C_{theor} —anti-D IgG content values taken as true, RSD —relative standard deviation, R^2 —coefficient of determination.

установленным критериям приемлемости результатов. Таким образом, методика количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА методом ИФА с использованием

эритроцитов фенотипа CCDee обладает прецизионностью.

Оценку линейности аналитического диапазона количественного определения анти-D-Ат

Таблица 2. Результаты оценки правильности количественного определения анти-D-антител IgG методом иммуноферментного анализа с использованием эритроцитов фенотипа CCDee

Table 2. Results of trueness evaluation of the enzyme immunoassay method for anti-D IgG quantification using CCDee erythrocytes

Фенотип эритроцитов <i>Phenotype of erythrocytes</i>	$C_{теор}, ME/мл$ $C_{theor}, IU/mL$	$C_{изм}, ME/мл$ $C_{meas}, IU/mL$	$U_{ф}$ U_{obt}	$U_{к}$ U_{crit}	$r, \%$	Средние значения, % <i>Mean values, %</i>	ДИ (P=95%), % <i>CI (P=95%), %</i>
CCDee	30,0	30,7±3,34	16	3	102,37	100,5	100,5±5,37
	15,0	14,87±2,11	15		99,10		
	7,5	7,59±4,58	16		101,21		
	3,75	3,87±0,60	12		103,23		
	1,88	1,82±0,61	12		96,57		

Примечание. $C_{теор}$ — значения содержания анти-D-Ат IgG, принимаемые за истинные, $C_{изм}$ — содержание анти-D-Ат IgG в испытуемых образцах, $U_{ф}$ — фактическое значение U -критерия Манна–Уитни, $U_{к}$ — критическое значение U -критерия Манна–Уитни; r — степень извлечения анти-D-Ат IgG в испытуемых образцах, ДИ — доверительный интервал.

Note. C_{theor} —anti-D IgG content values taken as true, C_{meas} —anti-D IgG content values measured in the test samples, U_{obt} —obtained values of Mann–Whitney U -test, U_{crit} —critical values of Mann–Whitney U -test, r —anti-D IgG recovery from the test samples, CI —confidence interval.

Таблица 3. Результаты оценки промежуточной прецизионности количественного определения анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) с использованием эритроцитов фенотипа CCDee

Table 3. Results of intermediate precision evaluation of the enzyme immunoassay method for anti-D-IgG quantification in human anti-D (Rh₀) immunoglobulin preparations using CCDee erythrocytes

Аналитик <i>Analyst</i>	Препарат <i>Preparation</i>	Дни <i>Days</i>	$C_{изм}, ME/мл$ $C_{meas}, IU/mL$	Среднее значение, МЕ/мл <i>Mean value, IU/mL</i>	SD	$RSD, \%$	RSD , среднее значение, % <i>RSD, mean value, %</i>	ДИ (P=95%), МЕ/мл <i>CI (P=95%), IU/mL</i>
1	№ 1	1	754	750,4	26,56	3,54	6,48	±21,25
		2	792					
		3	739					
	№ 2	1	753,5					
		2	754					
		3	710					
2	№ 1	1	734	737,5	65,6	8,89	6,48	±52,49
		2	686					
		3	807					
	№ 2	1	770					
		2	791					
		3	637					

Примечание. $C_{изм}$ — содержание анти-D-Ат IgG в испытуемых образцах, SD — стандартное отклонение, RSD — относительное стандартное отклонение, ДИ — доверительный интервал.

Note. C_{meas} —anti-D IgG content values measured in the test samples, SD —standard deviation, RSD —relative standard deviation, CI —confidence interval.

IgG в препаратах ИГЧА с использованием эритроцитов фенотипа CCDee проводили десятью испытаниями с применением растворов МСО, содержащих 30, 15, 7,5, 3,75, 1,88 МЕ/мл анти-D-Ат IgG (табл. 4).

Величина RSD (%) значений ОП растворов МСО не превышала 11,0% и соответствовала

установленным критериям приемлемости результатов ($\leq 20\%$). Графики зависимости значений ОП от значений содержания анти-D-Ат IgG в растворах МСО характеризовались линейностью, коэффициенты детерминации линейной регрессии (R^2) были не менее 0,9 (рис. 1), что свидетельствовало о наличии линейной зависимо-

Таблица 4. Результаты оценки линейности аналитического диапазона количественного определения анти-D-антител IgG иммуноферментным методом с использованием эритроцитов фенотипа CCDee
Table 4. Results of linearity range evaluation of the enzyme immunoassay method for anti-D IgG quantification using CCDee erythrocytes

$C_{MCO}, \text{МЕ/мл}$ $C_{IS}, \text{IU/mL}$	Оптическая плотность растворов МСО, относительные единицы <i>Absorbance of IS solutions, arbitrary units</i>	<i>RSD, %</i>
1,88	0,738±0,017	2,3
3,75	0,626±0,021	3,5
7,5	0,536±0,026	4,8
15,0	0,379±0,024	5,8
30,0	0,260±0,025	11,0

Примечание. МСО – международный стандартный образец, C_{MCO} – содержание анти-D-антител IgG в растворах МСО, *RSD* – относительное стандартное отклонение.
Note. IS – international standard, C_{IS} – anti-D IgG content in IS solutions, *RSD* – relative standard deviation.

сти в аналитическом диапазоне содержания анти-D-Ат IgG от 1,88 до 30 МЕ/мл.

Оценку селективности и специфичности количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА с использованием эритроцитов фенотипа CCDee рассматривали как способность методики однозначно оценивать содержание анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА в присутствии сопутствующих компонентов. Для исследования валидационных характеристик использовали препараты ИГЧА различного состава (препараты № 1, 2). Селективность и специфичность подтверждалась соответствием критериям приемлемости результатов, доказывающих, что входящие в состав препаратов дополнительные вещества (стабилизаторы – глицин, натрия хлорид, альбумин человека) не влияют на количественное определение содержания анти-D-Ат IgG (табл. 3).

При параллельном воспроизведении методики в качестве испытуемого образца использовали раствор СО иммуноглобулина человека

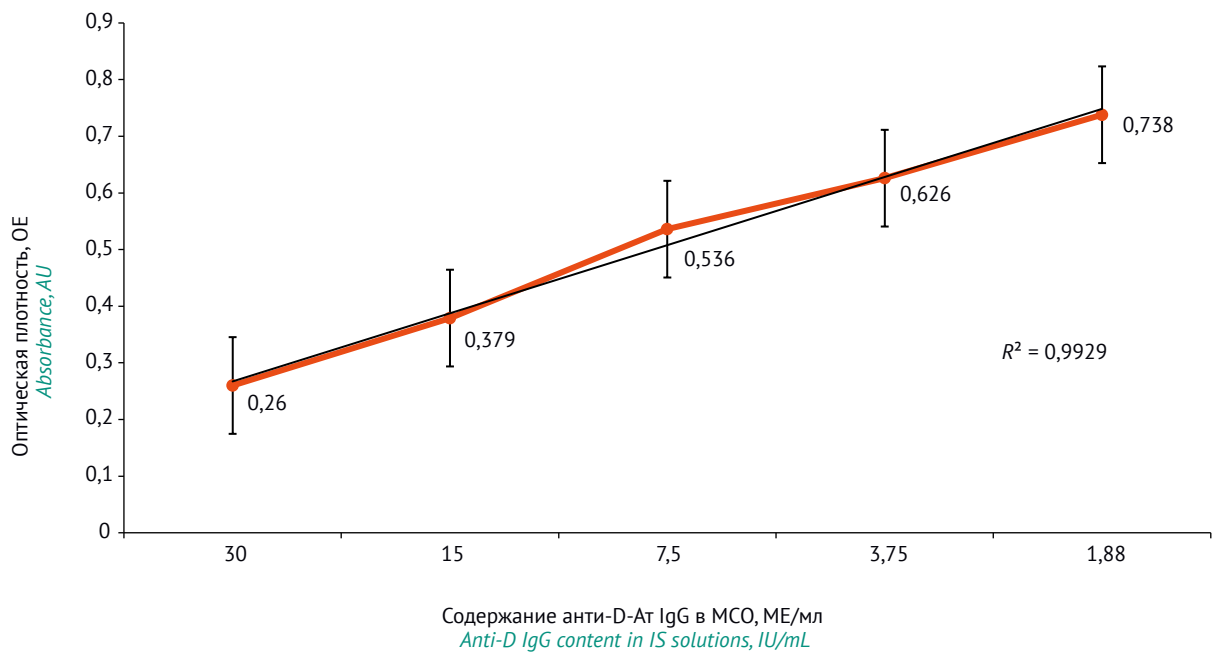


Рис. 1. Определение содержания анти-D-антител IgG в растворах Международного стандартного образца (МСО) при коэффициенте детерминации $R^2 \geq 0.9$: — при использовании эритроцитов фенотипа CCDee, — линия тренда средних значений при $n=10$.
Fig. 1. Anti-D IgG quantification in international standard (IS) solutions with the coefficient of determination of $R^2 \geq 0.9$: — results obtained with CCDee erythrocytes; — trend line for means, $n=10$.

Таблица 5. Результаты оценки количественного определения анти-D-антител IgG в препарате № 1 с помощью иммуносорбента, приготовленного с использованием эритроцитов фенотипов CCDee и ccDEE

Table 5. Results of evaluation of anti-D IgG quantification in preparation No. 1 using the immunosorbents prepared with CCDee and ccDEE erythrocytes

Фенотип эритроцитов <i>Phenotype of erythrocytes</i>	$C_{изм}$, МЕ/мл C_{meas} , IU/mL	Среднее значение, МЕ/мл <i>Mean value, IU/mL</i>	<i>SD</i>	<i>RSD, %</i>	ДИ (<i>P</i> =95%), МЕ/мл <i>CI (P=95%), IU/mL</i>	$t_{теор}$ t_{theor}	t_{ϕ} t_{obt}
CCDee	754	758,56	72,15	9,51	±47,14	2,30	1,24
	734						
	686						
	792						
	844						
	807						
	739						
	844						
	627						
ccDEE	748	798,78	51,71	6,47	±33,78		
	730						
	833						
	794						
	792						
	891						
	776						
	771						
	854						

Примечание. $C_{изм}$ — содержание анти-D-антител IgG в препарате № 1, SD — стандартное отклонение, RSD — относительное стандартное отклонение, ДИ — доверительный интервал, $t_{теор}$ — теоретическое значение t -критерия Стьюдента, $t_{ф}$ — фактическое значение t -критерия Стьюдента.

Note. C_{meas} —anti-D IgG content values measured in preparation No. 1, SD —standard deviation, RSD —relative standard deviation, CI—confidence interval, t_{theor} —theoretical value of Student's t -test, t_{obt} —obtained value of Student's t -test.

нормального, не содержащего анти-D-Ат IgG. При его применении наблюдалось отсутствие конкуренции с биотинилированными моноклональными анти-D-Ат, что подтверждалось развитием яркого окрашивания реакционной смеси после внесения стоп-реагента, а также высокими значениями ОП ($OE > 2$, $n=10$) при учете результатов с использованием спектрофотометра.

При параллельном воспроизведении методики при внесении растворов МСО, испытуемых образцов и биотинилированных моноклональных анти-D-Ат в лунки иммуносорбента, приготовленного с использованием D-отрицательных эритроцитов фенотипа ccdee, не наблюдалось образования комплексов Аг–Ат, что подтверждалось отсутствием окрашивания реакционной смеси после внесения стоп-реагента при визуальной оценке, а также значениями ОП значительно ниже аналитическо-

го диапазона определения — $0,050 \pm 0,007$ ОЕ ($n=10$), при учете результатов с использованием спектрофотометра.

Таким образом, продемонстрирована специфичность методики количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА с использованием эритроцитов фенотипа CCDee.

Оценку устойчивости методики и сопоставимость результатов проводили для подтверждения возможности применения эритроцитов фенотипа CCDee как альтернативного фенотипу ccDEE при количественном определении анти-D-Ат IgG методом ИФА. Для этого готовили иммуносорбент с использованием эритроцитов двух фенотипов и определяли содержание анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА различного состава для внутримышечного (препарат № 1) и внутривенного (препарат № 2) введения (по 18 определений для каждого препарата). Результаты

Таблица 6. Результаты оценки количественного определения анти-D-антител IgG в препарате № 2 с помощью иммуносорбента, приготовленного с использованием эритроцитов фенотипов CCDee и ccDEE

Table 6. Results of evaluation of anti-D IgG quantification in preparation No. 2 using the immunosorbents prepared with CCDee and ccDEE erythrocytes

Фенотип эритроцитов <i>Phenotype of erythrocytes</i>	$C_{изм}$, МЕ/мл C_{meas} , IU/mL	Среднее значение, МЕ/мл <i>Mean value, IU/mL</i>	<i>SD</i>	<i>RSD</i> , %	ДИ (P=95%), МЕ/мл <i>CI (P=95%), IU/mL</i>	$t_{теор}$ t_{theor}	t_{ϕ} t_{obt}
CCDee	753,5	779,17	80,8	10,37	±52,79	2,30	0,79
	754						
	791						
	637						
	710						
	770						
	890						
	888						
	819						
ccDEE	763	751,94	78,03	10,38	±50,98		
	883						
	681						
	700						
	674						
	743,5						
	763						
	691						
	869						

Примечание. $C_{изм}$ — содержание анти-D-антител IgG в препарате № 2, SD — стандартное отклонение, RSD — относительное стандартное отклонение, ДИ — доверительный интервал, $t_{теор}$ — теоретическое значение t -критерия Стьюдента, $t_{ф}$ — фактическое значение t -критерия Стьюдента.

Note. C_{meas} —anti-D IgG content values measured in preparation No. 2, SD—standard deviation, RSD—relative standard deviation, CI—confidence interval, t_{theor} —theoretical value of Student's t -test, t_r —actual value of Student's t -test.

оценки количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА представлены в таблицах 5 и 6 и на рисунке 2.

Возможность применения эритроцитов фенотипа CCDee как альтернативного фенотипу ccDEE для количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА иммуноферментным методом подтверждалась отсутствием статистической значимости различий данных при оценке независимых выборок (результаты количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах № 1, 2). С помощью t -критерия Стьюдента показано, что для препарата № 1 $t_{ф}=1,24$ меньше $t_{теор}=2,30$ (табличного при $P=95\%$), для препарата № 2 — $t_{ф}=0,79$ меньше $t_{теор}=2,30$ (табличного при $P=95\%$). Далее с помощью U -критерия Манна—Уитни для независимых групп данных для двух препаратов было установлено, что $U_{к}=18$ меньше $U_{ф}=21$.

Проведенная валидация методики количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА методом ИФА по ключевым параметрам: правильность, промежуточная прецизионность (повторяемость и внутрилабораторная воспроизводимость), линейность аналитического диапазона, селективность, специфичность, устойчивость методики и сопоставимость результатов при использовании эритроцитов фенотипов CCDee и ccDEE позволила установить следующие критерии приемлемости оценки результатов: 1) относительные значения содержания анти-D-Ат IgG в испытуемом образце должны быть в интервале от 80 до 120% ($\pm 20\%$) от номинального (установленного) значения; 2) при построении графика зависимости значений ОП от значений содержания анти-D-Ат IgG в растворах МСО коэффициент детерминации (R^2) линейной регрессии должен быть не ме-

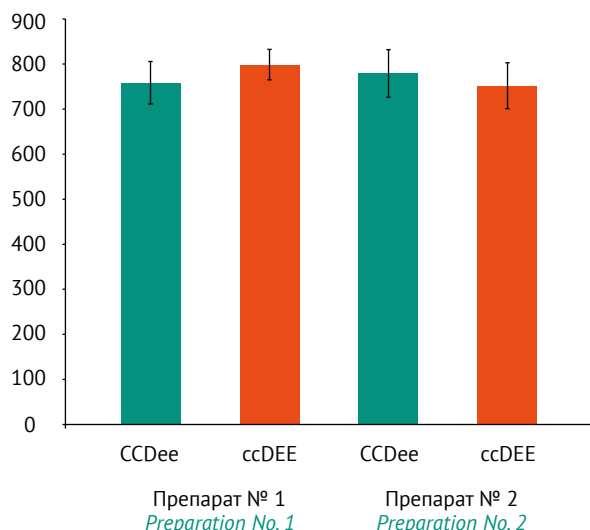


Рис. 2. Результаты оценки устойчивости методики и сопоставимости результатов при количественном определении анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) с использованием эритроцитов фенотипа CCDee и ccDEE. По оси ординат – содержание анти-D-антител IgG, МЕ/мл.

Fig. 2. Results of the evaluation of the analytical procedure's robustness and the comparability of the results of anti-D IgG quantification in human anti-D (Rh₀) immunoglobulin preparations using CCDee and ccDEE erythrocytes. Y axis – anti-D IgG content, IU/mL.

Литература/References

1. Савельева ГМ, Курцер МА, Панина ОБ, Сичинава ЛГ, Клименко ПА, Конопляников АГ, Алексеенкова МВ. Диагностика, лечение, профилактика гемолитической болезни плода при резус-сенситизации. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2006;51(6):73–8. [Savel'eva GM, Kurcer MA, Panina OB, Sichinava LG, Klimenko PA, Konopljannikov AG, Alekseenkova MV. Diagnosis, treatment, prevention of fetal hemolytic disease in RH-sensitization. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*. 2006;51(6):73–8 (In Russ.)]
2. Hannafin B, Lovecchio F, Blackburn P. Do Rh-negative women with first trimester spontaneous abortions need Rh immune globulin? *Am J Emerg Med*. 2006;24(4):487–90. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2006.01.020>
3. Scott ML. The complexities of the Rh system. *Vox Sang*. 2004;87:58–62. <https://doi.org/10.1111/j.1741-6892.2004.00431.x>
4. MacKenzie IZ, Roseman F, Findlay J, Thompson K, Jackson E, Scott J, Reed M. The kinetics of routine antenatal prophylactic intramuscular injections of polyclonal anti-D immunoglobulin. *BJOG*. 2006;113(1):97–101. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2005.00789.x>
5. Thorpe SJ, Sands D, Rautmann G, Schäffner G. International collaborative study to evaluate methods for quantification of anti-D in immunoglobulin preparations. *Vox Sang*. 2002;83(1):42–50. <https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.2002.00169.x>
6. Шведова ЕВ, Кудашева ЭЮ, Климов ВИ. Методы оценки специфической активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D): современное состояние проблемы. *Иммунология*. 2020;41(3):256–61. [Shvedova EV, Kudasheva EYu, Klimov VI. Methods for evaluating the specific activity of preparations of human antirhesus Rh₀(D): current status of the problem. *Immunologiya = Immunology*. 2020;41(3):256–61 (In Russ.)] <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-3-256-261>
7. Донсков СИ, Мороков ВА. *Группы крови человека: руководство по иммуносерологии*. М.: ИП Скороходов ВА; 2011. [Donskov SI, Morokov VA. *Human blood groups: a guide to immunoserology*. Moscow: IP Skorohodov VA; 2011 (In Russ.)]
8. Thorpe SJ, Turner CE, Heath AC, Sands D. A competitive enzyme-linked immunoassay using erythrocytes fixed to microtitre plates for anti-D quantitation in immunoglobulin products. *Vox Sang*. 2000;79(2):100–7. <https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.2000.7920100.x>
9. Шведова ЕВ, Лешина СА, Давыдов ДС, Борисевич ИВ, Кудашева ЭЮ. Разработка критериев имобилизации эритроцитов человека фенотипов R1R1 и R2R2 на твердой фазе при определении содержания анти-D-антител IgG в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) методом иммуноферментного анализа. *Иммунология*. 2022;43(2):208–16. [Shvedova EV, Leshina SA,

нее 0,9; 3) относительное стандартное отклонение (RSD, %) трех значений ОП, ОЕ для каждой концентрации не должно превышать 20%.

Заключение

В ходе проведенных валидационных исследований получены результаты, демонстрирующие возможность применения эритроцитов фенотипа CCDee как альтернативного фенотипу ccDEE для количественного определения анти-D-Ат IgG в препаратах ИГЧА иммуноферментным методом. Разработанные критерии приемлемости оценки результатов количественного определения анти-D-Ат IgG иммуноферментным методом с использованием эритроцитов фенотипов CCDee и ccDEE для приготовления иммуносорбента гарантируют достоверность получаемых результатов количественного определения анти-D-Ат IgG, что позволяет их использовать специалистами контрольно-аналитических лабораторий для оценки качества препаратов ИГЧА. Количественное определение анти-D-Ат IgG с использованием наиболее распространенного фенотипа эритроцитов CCDee в дополнение к фенотипу ccDEE расширяет возможности применения селективного иммуноферментного метода.

Davydov DS, Borisevich IV, Kudasheva EYu. Development of criteria for immobilization of human erythrocytes of phenotypes R1R1 and R2R2 on the solid phase in determining the content of anti-D-antibodies IgG in immunoglobulin human antirhesus Rh₀(D) preparations by enzyme immunoassay.

Immunologiya = Immunology. 2022;43(2):208–16 (In Russ.) <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2022-43-2-208-216>

10. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика; 1998. [Glantz SA. *Primer of biostatistics*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1994]

Вклад авторов. **Е.В. Шведова** — дизайн исследования, проведение экспериментальных исследований по оценке правильности, промежуточной прецизионности, линейности, селективности, специфичности, устойчивости и сопоставимости результатов при валидации методики, анализ результатов, написание текста рукописи; **С.А. Лешина** — проведение экспериментальных исследований по оценке промежуточной прецизионности и сопоставимости результатов при валидации методики; **Э.Ю. Кудашева** — дизайн исследования, интерпретация результатов, написание текста рукописи; **И.В. Борисевич** — концепция исследования; **В.А. Меркулов** — концепция исследования, утверждение окончательной версии статьи для публикации; **Д.В. Шведов** — дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов, написание текста рукописи.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Конфликт интересов. В.А. Меркулов является главным редактором, И.В. Борисевич — членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Authors' contribution. **E.V. Shvedova**—elaboration of the study design, experimental evaluation of trueness, intermediate precision, linearity, selectivity, specificity, robustness and comparability of the results of the analytical procedure during its validation, analysis of the results, writing of the text of the manuscript; **S.A. Leshina**—experimental evaluation of intermediate precision and comparability of the results of the analytical procedure during its validation; **E.Yu. Kudasheva**—elaboration of the study design, interpretation of the results, writing of the text of the manuscript; **I.V. Borisevich**—elaboration of the study concept; **V.A. Merkulov**—elaboration of the study concept, approval of the final version of the manuscript for publication; **D.V. Shvedov**—elaboration of the study, analysis and interpretation of the results, writing of the text of the manuscript.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project № 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

Conflict of interest. V.A. Merkulov is the Editor-in-Chief, I.V. Borisevich is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Шведова Евгения Владимировна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9229-3677>
NovikovaEV@expmed.ru

Лешина Светлана Анатольевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9482-3483>
Leshina@expmed.ru

Кудашева Эльвира Юрьевна, д-р мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5838-2481>
Kudasheva@expmed.ru

Борисевич Игорь Владимирович, д-р мед. наук, проф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0713-7419>
borisevichiv@fmba.gov.ru

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>
merkulov@expmed.ru

Шведов Дмитрий Владимирович, канд. мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6945-4145>
Shvedov@expmed.ru

Evgeniya V. Shvedova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9229-3677>
NovikovaEV@expmed.ru

Svetlana A. Leshina. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9482-3483>
Leshina@expmed.ru

Elvira Yu. Kudasheva, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5838-2481>
Kudasheva@expmed.ru

Igor V. Borisevich, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0713-7419>
borisevichiv@fmba.gov.ru

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>
merkulov@expmed.ru

Dmitry V. Shvedov, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6945-4145>
Shvedov@expmed.ru

Поступила 19.04.2022

После доработки 22.08.2022

Принята к публикации 26.08.2022

Received 19 April 2022

Revised 22 August 2022

Accepted 26 August 2022