

На правах рукописи

Устинникова Ольга Борисовна

**СТАНДАРТИЗАЦИЯ И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДОВ РАКЕТНОГО
ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗА И ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
АНАЛИЗА ПРИ КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА МЕДИЦИНСКИХ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

14.00.36 – аллергология и иммунология

Автореферат

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2007

Работа выполнена в ФГУН Государственном научно-исследовательском институте стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:

Кандидат биологических наук
Волкова Рауза Асхатовна

Доктор биологических наук
Петухов Валерий Георгиевич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Доктор биологических наук
Лютов Андрей Германович

Кандидат медицинских наук
Свиридов Валерий Васильевич

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

ФГУН Ростовский НИИ Микробиологии и паразитологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится « ____ » _____ 2008г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.02 при ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, г.Москва

Автореферат разослан « ____ » _____ 2007г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Л.И.Новикова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Развитие медицины, широкое внедрение медицинских биологических препаратов, новые критерии обеспечения жизнедеятельности человека предъявляют повышенные требования к безопасности и качеству биофармацевтических продуктов.

В технологической практике одним из важнейших документов, определяющим требования к производству и контролю качества лекарственных средств для человека и животных, являются «Правила производства лекарственных средств» - «Good Manufacturing Practice for Medicinal Products (GMP)».

Правила GMP устанавливают требования к системе управления качеством, контролю качества, персоналу, помещениям и оборудованию, документации, производству продукции, проведению анализов и др.

Валидация (аттестация) – одна из составляющих частей GMP, проведение которой гарантирует, что поддерживающие системы, оборудование, процессы и тестирование находятся на должном уровне и, поэтому, производимая продукция отвечает заложенным в нормативной документации требованиям качества.

Необходимость валидации методов контроля медицинских иммунобиологических препаратов определена рекомендациями Всемирной организации здравоохранения, а также отечественными нормативными документами (ГОСТ Р 52249-2004 Национальный стандарт Российской Федерации. Правила производства и контроля качества лекарственных средств; СП 3.3.2.1288-03 «Надлежащая практика производства медицинских иммунобиологических препаратов»).

Для того чтобы аналитическая методика заняла свое место в системе

качества, соответствовала своему назначению, то есть гарантировала результаты с установленной точностью, требуется ее валидация. Разработка принципов валидации методов контроля для установления характеристик методик и показателей их точности является актуальной задачей.

Имеющиеся в литературе рекомендации по валидации количественных методов контроля указывают перечень необходимых для установления характеристик, но не устанавливают алгоритм проведения процесса валидации. Разнообразие МИБП* и методов их контроля допускает различия в процедуре валидации, однако разработка общих принципов валидации количественных методов является важнейшим моментом этой процедуры для аналогичных методов контроля.

При контроле качества МИБП важное место занимают отраслевые стандартные образцы, являющиеся необходимой метрологической составляющей системы обеспечения качества, особенно при отсутствии международных или государственных стандартных образцов.

В настоящее время нормативная база, определяющая порядок аттестации стандартных образцов, предполагает использование в процессе получения аттестованного значения стандартного образца не менее десяти квалифицированных лабораторий, что, как правило, невозможно обеспечить при аттестации отраслевых стандартных образцов МИБП ввиду ограниченного количества производств данных препаратов.

*

БСА – Бычий сывороточный альбумин
ИФА – Иммуноферментный анализ
МИБП – Медицинские иммунобиологические препараты
МИ – Методические инструкции
МУ – Методические указания
ОСО – Отраслевой стандартный образец
РИЭФ – Ракетный иммуноэлектрофорез
СП – Санитарные правила
СРС – Сыворотка рогатого скота

Сложность и многоэтапность методов контроля МИБП, непроработанность принципов валидации, пробелы в нормативном обеспечении порядка аттестации отраслевых стандартных образцов определяют актуальность работы по совершенствованию системы обеспечения качества аналитических работ при контроле медицинских биологических препаратов.

Определение порядка аттестации отраслевых стандартных образцов в условиях ограниченного числа квалифицированных лабораторий и разработка принципов валидации количественных методов контроля являются основой совершенствования системы обеспечения качества и безопасности биофармацевтической продукции.

Цель исследования - стандартизация и разработка принципов валидации иммунохимических методов контроля качества бактериальных и вирусных вакцин – ракетного иммуноэлектрофореза и иммуноферментного анализа.

Задачи исследования:

1. Аттестация ОСО содержания Ви-антигена и ОСО содержания БСА.
2. Валидация метода РИЭФ для количественного определения:
 - а) содержания Ви-антигена в брюшнотифозной вакцине «Вианвак»;
 - б) содержания БСА в культуральных вирусных вакцинах.
3. Валидация иммуноферментной тест-системы «Immunoenzymetric Assay for the Measurement of BSA», производства «Cygnus Technologies, Inc.» USA для контроля остаточных количеств БСА в паротитной вакцине и ее вирусных сборах.

Научная новизна

Разработан порядок аттестации ОСО для иммунохимического метода (РИЭФ) контроля МИБП с применением регрессионного анализа при про-

ведении статистической обработки, позволяющий использовать в процессе аттестации ограниченное число лабораторий.

Определен порядок валидации метода заключающийся в определении характеристик метода и показателей точности. Разработан принцип планирования эксперимента и порядок валидации иммунохимических методов контроля МИБП как при определении специфического активного компонента, так и при определении примеси.

Показана возможность использования стандартного отклонения для нулевой концентрации при расчете предела обнаружения и предела количественного определения количественных иммунохимических методов контроля МИБП.

Практическая значимость работы

Практическая значимость работы связана с обоснованной необходимостью проведения валидации и стандартизации количественных методов контроля качества ряда иммунобиологических препаратов.

Использование аттестованных стандартных образцов – ОСО содержания Ви-антигена и ОСО содержания бычьего сывороточного альбумина, позволяет стандартизовать условия проведения соответствующих анализов в разных лабораториях.

Результаты валидации метода РИЭФ позволяют применять данный метод для определения БСА в культуральных вирусных вакцинах и для определения Ви-антигена в брюшнотифозной полисахаридной вакцине «Вианвак».

Результаты валидации метода ИФА с применением тест-системы производства фирмы “Cygnus Technologies, Inc.”, USA позволяют применять данную тест-систему для определения остаточных количеств БСА в паротитной вакцине и ее вирусных сборах.

Внедрение результатов работы

Отраслевой стандартный образец содержания Ви-антигена используется при контроле качества брюшнотифозной вакцины «Вианвак».

Отраслевой стандартный образец содержания БСА используется при контроле качества культуральных вирусных вакцин: коревой, краснушной, паротитной, герпетической, антирабической и вакцины против клещевого энцефалита.

Материалы диссертации включены в Методические указания 3.3.2.1886-04 «Валидация методов контроля химических и физико-химических показателей качества МИБП: организация, порядок проведения и представления результатов», М.,2004.

Положения, выносимые на защиту

1.Использование регрессионного анализа при аттестации ОСО Ви-антигена позволяет статистически доказать, что имеющиеся различия показателей качества субстанции в пределах требований НД, не влияют на результаты аттестации.

2. Разработанный принцип планирования эксперимента и использование стандартного отклонения для нулевой концентрации при расчете предела обнаружения и предела количественного определения позволяет проводить валидацию количественных иммунохимических методов, использующихся при определении примеси.

3. Разработанный принцип планирования эксперимента и оценка неопределенности положения линии регрессии при построении градуировочной характеристики позволяет проводить валидацию количественных иммунохимических методов при определении специфически активного компонента.

Апробация материалов диссертации

Диссертация прошла апробацию на заседании Ученого совета ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора 26 декабря 2006 г. Основные экспериментальные материалы и положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на Первой Всероссийской конференции по вакцинологии «Медицинские иммунобиологические препараты для профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекций», Москва 10-11 ноября 2004; на Второй международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность», Москва, 2005; на конференции «Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний», Нижний Новгород, 2006; на конференции «Вакцинология 2006. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней», Москва, 2006.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ.

Объем и структура и диссертации

Диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста, включает 48 таблиц, 25 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, заключений, выводов и списка цитированной литературы. Библиография включает 51 отечественный и 52 зарубежных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Вакцина паротитная и полуфабрикат к ней, производство ФГУН «НПО Микроген». Вакцина «Вианвак» и полуфабрикат к ней, производство ООО «Гритвак». Вакцина «Turphim Vi» производство Авентис Пастер, Франция.

Сыворотка преципитирующая белки сыворотки крови рогатого скота (СРС) адсорбированная кроличья диагностическая для судебно-медицинских целей жидкая, производство ФГУП Санкт-Петербургский НИИВС (*титр антител 1:10000. Разведение 1:100*).

Бычий сывороточный альбумин (Albumin, bovine., Sigma., A-4503, Lot 98F-0047.

ОСО 42-28-323-03П для построения калибровочного графика при определении белка для метода Лоури.

Сыворотка кроличья против Ви-антигена производство ООО «Гритвак» (*титр антител к Salmonella typhi в реакции агглютинации составляет 1:1600*).

Наборы тест-системы для определения БСА производства фирмы «Cygnus Technologies, Inc.», USA.

Методы:

1. Твердофазный иммуноферментный анализ, метод двойных антител («сэндвич» метод). Проводили в соответствии с инструкцией прилагаемой к тест-системе «Immunoenzymetric Assay for the Measurement of BSA», производства «Cygnus Technologies, Inc.» USA
2. Метод ракетного иммуноэлектрофореза (Фармакопейная статья 42-3874-99 Физико-химические, химические и иммунохимические методы контроля медицинских биологических препаратов. МЗ РФ ФГК. М. 2000. С. 77.)
3. Химические методы: определение О-ацетильных групп, нуклеиновых кислот, белка методом Лоури, фенола.
4. Методы статистической обработки результатов:
 - регрессионный анализ;
 - оценка неопределенности положения линии регрессии;
 - однофакторный дисперсионный анализ.

Экспериментальные материалы, необходимые для аттестации ОСО содержания Ви-антигена и валидации метода РИЭФ для определения Ви-антигена были получены совместно с лабораторией иммунохимической диагностики НИИВС им. И.И.Мечникова.

Экспериментальные материалы, необходимые для проведения валидации ИФА тест-системы “Cygnus Technologies, Inc.”, были получены совместно с иммунохимической лабораторией Московского подразделения по производству бактериальных препаратов ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ на базе последнего.

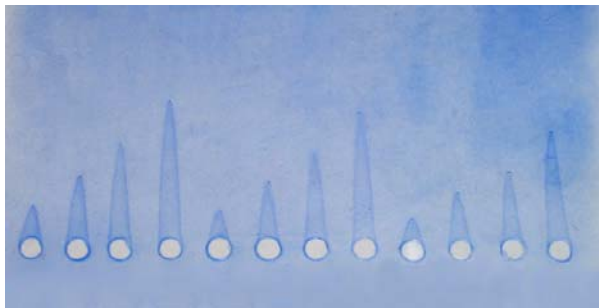
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Аттестация ОСО содержания Ви - антигена.

Для количественного определения Ви-антигена в брюшнотифозной вакцине «Вианвак» используют метод ракетного иммуноэлектрофореза (РИЭФ). Метод предполагает использование калибровочного графика при каждом анализе. В качестве стандартного образца используют одну из серий брюшнотифозной вакцины «Вианвак», аттестованную как отраслевой стандартный образец содержания Ви-антигена. Для аттестации СО в этом случае может быть использован очищенный лиофилизированный Ви-полисахарид, являющийся субстанцией вакцины: его раствор, приготовленный по точной навеске. Однако разные серии полисахарида различаются между собой в пределах требований нормативной документации, а готовые серии вакцины отличаются по составу от субстанции, что может влиять на результаты определения содержания Ви-антигена методом РИЭФ в целом, и на аттестацию ОСО в частности.

Было изучено влияние вышеуказанных различий на результат аттестации. Для того, чтобы избежать эффекта множественных сравнений, на одном стекле анализировали 3 образца: кандидат в ОСО – вакцина «Вианвак» (серия 181), субстанция к этой серии и субстанция вакцины «Вианвак» произвольно выбранной серии. Для каждого образца использовали 4 концентрации 5,10,15 и 20 мкг/мл. Эксперимент повторяли 4 раза, меняя серию произвольной субстанции. В одном эксперименте, вместо производственной субстанции использовали вакцину «Тифим Ви», производство Авентис Пастер. На рисунке 1 представлена типичная электрофореграмма

данного эксперимента. С помощью программы Excel для каждого образца строили график зависимости «Концентрация Ви-антигена – высота «ракеты» и находили уравнение линейной регрессии. Для оценки значимости различий линий регрессии применяли регрессионный анализ, заключающийся в сравнении коэффициентов наклона b , коэффициентов сдвига a , сравнения двух линий в целом (по F-критерию) [Гланц С., 1999].



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Рисунок 1. Типичная электрофореграмма при аттестации ОСО.
 1-4 - Полуфабрикат серия № 181. Концентрации 5; 10; 15; 20 мкг/мл.
 5-8 - Полуфабрикат серия № 150103. Концентрации 5; 10; 15; 20 мкг/мл.
 9-12 - Вакцина «Вианвак» серия №181. Разведение в 10; 5; 3,3; 2,5 раза

Результаты регрессионного анализа свидетельствуют, что для линий регрессии субстанций, расположенных на одной электрофореграмме значения критерия Стьюдента для коэффициентов a и b , а также значения F-критерия (при сравнении линий в целом) ниже критических (табличных) значений вышеуказанных критериев. Это позволило сделать вывод о статистической незначимости различий линий регрессии зависимости «Концентрация Ви-антигена – высота «ракеты» для субстанций, расположенных на одной электрофореграмме (таблица 1).

Кроме этого, провели однофакторный дисперсионный анализ групп результатов определения содержания Ви-антигена в серии 181 брюшно-тифозной вакцины «Вианвак», рассчитанных по двум уравнениям линейной регрессии для субстанций, расположенных на одной электрофореграмме. Полученные результаты (таблица 2), также свидетельствуют об отсутствии статистически значимых различий между значениями содержания Ви-антигена в вакцине «Вианвак» серия 181, вычисленными по калибровочным графикам на основе разных субстанций, находящихся на

одной электрофореграмме - значения F критерия ниже табличных, т.е. результаты анализа не зависели от используемой субстанции. Отсутствие статистически значимых различий позволяет сделать вывод о возможности использования для аттестации ОСО содержания Ви-антигена любой субстанции соответствующей требованиям НД, т.е. и субстанции, из которой приготовлен СО.

Таблица 1

Сравнительный анализ линий регрессий, расположенных на одной электрофореграмме.

№ электрофореграммы	Серия субстанции	Критерий Стьюдента для коэф. <i>b</i>	Критерий Стьюдента для коэф. <i>a</i>	Критическое значение критерия Стьюдента	Критерий Фишера для сравнения линий в целом, F	Критическое значение F-критерия
электрофореграмма №1	181	$t = 0,6405$	$t = 0,2959$	$t_{\text{крит}}=2,78$	F = 0,9221	$F_{\text{крит}} = 6,94$
	150103					
электрофореграмма № 2	181	$t = 0,1736$	$t = 0,1279$		F = 3,5421	
	161002					
электрофореграмма №1	181	$t = 0,5140$	$t = 0,0839$	F = 1,8593		
	170902					
электрофореграмма №2	181	$t = 0,0699$	$t = 0,6589$	F = 0,1739		
	Тyphim-Vi U 0535-10					

Таблица 2

Результаты вычисления F-критерия для однофакторного дисперсионного анализа.

№ Электрофореграммы	$S^2_{\text{вну}}$	$S^2_{\text{меж}}$	F	F крит *
1	9,029	35,62	3,94	5,99
2	15,06	28	1,79	
3	15,0	15,36	1,02	
4	9,97	48,92	4,9	

Содержание Ви-антигена в кандидате в ОСО (серия 181 вакцины «Вианвак»), рассчитанное с использованием разных разведений (в 10, в 5, в 3,3 и в 2,5 раза) и одного калибровочного графика на одной электрофореграмме, приняли за 1 выборку из общей совокупности результатов. Всего таких выборок 8. Аттестованное значение вычисляли как среднее

арифметическое средних арифметических по выборкам. Доверительный интервал для среднего арифметического находили по формуле:

$$\bar{X}_{cp} - t_{\alpha} \times S_{\bar{x}} \leq \mu \leq \bar{X}_{cp} + t_{\alpha} \times S_{\bar{x}}, \quad [1]$$

где \bar{X}_{cp} - среднее средних арифметических по выборкам;

$S_{\bar{x}}$ - стандартная ошибка среднего арифметического, которую вычисляли по формуле:

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}, \quad [2]$$

где S – стандартное отклонение средних, которое вычисляли по формуле:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{X}_i - \bar{X}_{cp})^2}{n-1}}; \quad [3]$$

где n - число выборок.

t_{α} - критерий Стьюдента при доверительной вероятности 0,95 и числе степеней свободы $f = n - 1 = 7$.

Содержание Ви-антигена составило $42,1 \pm 2,2$ мкг/мл, с данным значением был аттестован ОСО содержания Ви-антигена 42-28-329-2003П.

Разработанную схему применили для аттестации следующей серии ОСО содержания Ви-антигена на основе вакцины «Вианвак» серия 200.

Аттестованное значение следующей серии ОСО содержания Ви-антигена составило $44,7 \pm 2,4$ мкг/мл (ОСО 42 – 28-383-2005).

Таким образом для аттестации ОСО содержания Ви-антигена разработана следующая схема:

1. Провести определение содержания Ви-антигена в кандидате в ОСО, расположив на одном стекле субстанцию к кандидату ОСО, кандидат ОСО и действующий ОСО, каждый образец в концентрации 5, 10, 15 и 20 мкг/мл Ви-антигена.

2. Оценить значимость различий полученных линий регрессий для субстанции кандидата ОСО, кандидата в ОСО и действующего ОСО, а именно сравнить коэффициенты наклона b , коэффициенты сдвига a и линии в целом;

3. В случае отсутствия статистически значимых различий, повторить эксперимент не менее 2-х раз, чтобы получить число выборок не менее 6;

4. Вычислить аттестованное значение и доверительный интервал с использованием формул [1,2,3].

2. Валидация метода ракетного иммуноэлектрофореза, применяемого для определения содержания Ви-антигена в брюшнотифозной вакцине «Вианвак».

Задачей валидации аналитической методики является определение ее характеристик и показателей точности.

Для определения линейности, предела обнаружения и предела количественного определения на 1 стекле располагали ОСО содержания Ви – антигена (серия 200) в 4-х разведениях, по 3 повтора на каждое разведение (всего 12 образцов) (рисунок 2). Для определения показателей точности метода (правильности и прецизионности) проводили эксперимент в двух лабораториях, повторяя процедуру не менее 3-х раз в каждой лаборатории, на одном и том же материале, получая тем самым возможность оценки воспроизводимости метода.

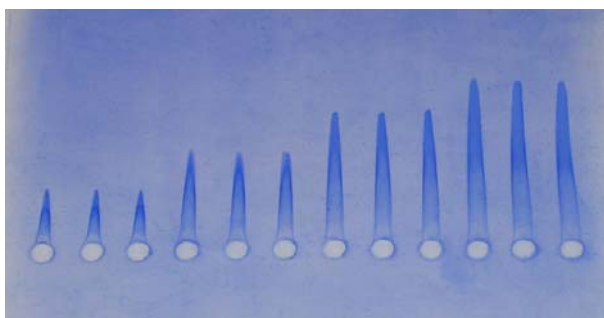


Рисунок 2. Типичная электрофореграмма при оценке линейности метода РИЭФ для определения содержания Ви-антигена с использованием вакцины «Вианвак» серия 200 (ОСО содержания Ви-антигена).

1-3 – концентрация Ви-антигена 5 мкг/мл;
4-6 – концентрация Ви-антигена 10 мкг/мл;
7-9 – концентрация Ви-антигена 15 мкг/мл;

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 **10-12** – концентрация Ви-антигена 20 мкг/мл

Строили график зависимости высоты пика («ракеты») от содержания Ви-антигена, для оценки линейности использовали регрессионный анализ. Коэффициент корреляции составил 0,997, что свидетельствует о сильной прямой зависимости переменных. Поскольку ОСО используется как мера сравнения - для построения калибровочного графика, оценили доверительную область линии регрессии по следующим формулам в соответствии с [Гланц Стентон, 1999.]

$$\bar{y} - t_{\alpha} S_y \leq y \leq \bar{y} + t_{\alpha} S_y, [4]$$

где \bar{y} - значение уравнения линейной регрессии в точке x ;

t_{α} - критерий Стьюдента при доверительной вероятности 0,95 и числе степеней свободы $f = n - 2$.

S_y - стандартная ошибка регрессии, которую вычисляли по формуле:

$$S_y = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{X})^2}{(n-1)S_x^2}}, [5]$$

где $S_{y|x}$ - остаточное стандартное отклонение, рассчитанное по формуле:

$$S_{y|x} = \sqrt{\frac{n-1}{n-2} \times (S_y^2 - b^2 S_x^2)}, [6]$$

где S_y^2 - дисперсия зависимой переменной y ;

S_x^2 - дисперсия независимой переменной x ;

b - коэффициент наклона линии регрессии.

Максимальная величина, характеризующая неопределенность линии регрессии определена для концентраций Ви-антигена 4,47 мкг и 17,9 мкг и составляет $\pm 0,7$ мм от высоты «ракеты».

В соответствии с документами International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures: Methodology, ICH-Q2B, 1996, предел обнаружения (ПО) вычисляли по стандартному отклонению: $ПО = S \times 3,3$; а предел количественного определения (ПКО) $= S \times 10$.

В настоящей работе в качестве стандартного отклонения принято стандартное отклонение для нулевой концентрации, которое впервые при контроле МИБП вычислили по формуле:

$$S_x = \frac{S_o}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \left(\frac{S_b}{b}\right)^2 \times \left(\frac{Y_o - \bar{Y}}{S_o}\right)^2}, \quad [7]$$

где m - число точек калибровочного графика;

n – число повторов в каждой точке;

b – коэффициент наклона линии регрессии;

S_o^2 - дисперсия разности между опытными y_i и рассчитанными по уравнению линейной регрессии \bar{y} значениями:

$$S_o^2 = \frac{\sum_{i=1}^m (y_i - \bar{y})^2}{m - 2}; \quad [8]$$

S_b^2 - дисперсия коэффициента b :

$$S_b^2 = \frac{S_o^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}; \quad [9]$$

Y_o - значение зависимой переменной y при $x=0$. Для $x = 0$ $y = a + \Delta a$ (коэффициент сдвига линии регрессии). Доверительный интервал для a есть Δa , который находили по формуле:

$$\Delta a = \pm t(P;f) \times S_a; \quad [10],$$

где t - критерий Стьюдента при доверительной вероятности $P=0,95$ и числе степеней свободы $f = m - 2$, где m – число точек калибровочного графика;

S_a - стандартная ошибка коэффициента сдвига линии регрессии, которую вычисляли по формуле:

$$S_a^2 = \frac{S_o^2 \sum x_i^2}{m \sum (x_i - \bar{x})^2} \quad [11]$$

\bar{Y} - среднее арифметическое значение зависимой переменной y с учетом значения Y_o .

Получили следующие величины: $S_x = 0,32$, предел обнаружения = 1,1 мкг/мл, предел количественного определения = 3,2 мкг/мл.

Используя ОСО содержания Ви- антигена (серия брюшнотифозной вакцины 200), оценили воспроизводимость метода – стандартное отклонение воспроизводимости S_R и предел воспроизводимости R в соответствии с [МУ «Валидация методов контроля химических и физико-химических показателей качества МИБП: организация, порядок проведения и представления результатов.», МУ 3.3.2.1886-04, 2004].

Стандартное отклонение воспроизводимости изменялось от 1,8 до 7,6 мкг/мл в зависимости от разведения ОСО, наименьший разброс значений выявлен при разведении в 3,3 раза: $S_R = 1,8$ мкг/мл. В связи с этим, данное разведение было выбрано для оценки содержания Ви-антигена при проведении анализа в дальнейшем. Предел воспроизводимости R для разведения в 3,3 раза составил 5,98 мкг/мл. Это означает, для того, чтобы быть уверенным, что содержание Ви-антигена в исследуемом образце соответствует требованиям нормативной документации (50 ± 15

мкг/мл или 35 – 65 мкг/мл), полученные результаты должны находиться в пределах $35+6 \leq X \leq 65-6$, т.е. 41 – 59 мкг/мл.

В дальнейшем, в качестве ОСО рекомендовано использовать одну из серий вакцины Вианвак с содержанием Ви-антигена в более узких, с учетом воспроизводимости метода, пределах чем для вакцины, например 50 ± 8 мкг/мл.

3. Валидация метода ракетного иммуноэлектрофореза для определения БСА с применением сыворотки против белков СРС.

Применение количественного анализа (РИЭФ), наряду с использованными ранее биологическим методом (тест анафилаксии) и методом двойной радиальной иммунодиффузии, обеспечило большую точность и правильность проведения контроля содержания БСА в препаратах. Разработанный метод предусматривает использование сыворотки против БСА. В связи с отсутствием коммерческой сыворотки против БСА изучили возможность использования в качестве источника антител сыворотки преципитирующей белки сыворотки крови рогатого скота, используемой для судебно-медицинских целей.

Применение сыворотки против СРС позволяет выявлять помимо БСА белки сыворотки крови рогатого скота (КРС). В НД на культуральные вирусные вакцины регламентируется содержание БСА. Для того чтобы дифференцировать БСА и другие сывороточные белки, анализ проводили с добавлением БСА до конечной концентрации 2 мкг/мл (как добавка), что позволило идентифицировать преципитат, соответствующий БСА (рисунок 3).

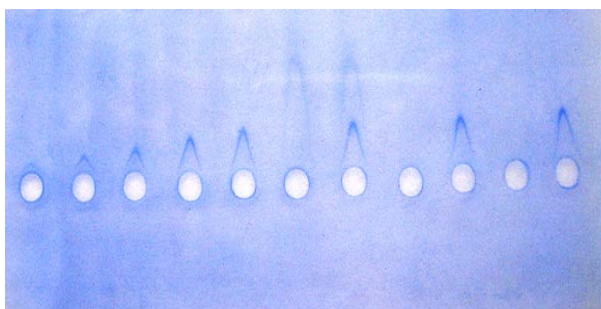


Рисунок 3. Выявление содержания БСА в антирабической вакцине методом РИЭФ с применением сыворотки против белков СРС.

1-5 – ОСО БСА концентрации 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мкг/мл соответственно.

6-7 – антирабическая вакцина. **6** – с добавкой воды, **7** – с добавкой БСА в конечной концентрации 2 мкг/мл.

1 2 3 4 5 6 7

Для сохранения концентрации БСА одновременно исследовали пробы с добавлением такого же объема воды.

Применение сыворотки против СРС требует подтверждения специфичности, линейности и правильности определения БСА методом РИЭФ. Поскольку максимальное содержание БСА в анализируемых препаратах 0,5 – 1,0 мкг/мл, предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО) метода должны соответствовать заявленным требованиям. Изучили возможность использования в качестве калибранта для построения калибровочного графика ОСО содержания белка, представляющий собой раствор БСА, приготовленный на карбонатно-фосфатном буферном растворе. На одном стекле располагали ОСО и раствор БСА, каждый в 5-ти разведениях (рисунок 4), измеряли высоту «ракет», с помощью программы Excel строили график и находили уравнение линейной регрессии.

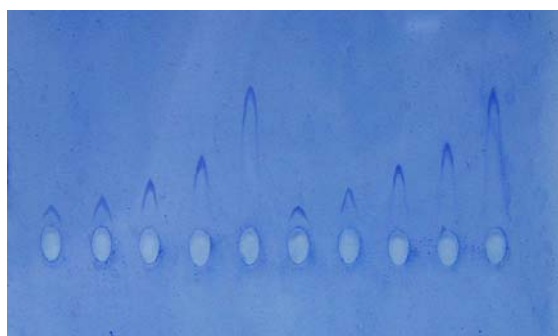


Рисунок 4. Выявление БСА методом РИЭФ с применением сыворотки против белков СРС.

1-5 – Калибровочный график с применением ОСО белка для метода Лоури. Концентрации БСА 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 соответственно.

6-10 – Калибровочный график с применением раствора БСА, приготовленного по точной навеске.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Концентрации 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мкг/мл.

Регрессионный анализ обеих линий зависимости «Концентрация БСА – высота «ракеты», для пары ОСО : Раствор БСА показал отсутствие статистически значимых различий коэффициентов наклона (b) и сдвига (a) линий регрессии, а также отсутствие различий в случае использования в качестве калибровочного графика какой-либо линии регрессии в отдельности или объединенной линии регрессии (таблица 3).

Таблица 3

Сравнительный анализ линий регрессий калибровочного графика с использованием ОСО содержания белка для метода Лоури (1) и раствора БСА.

Наименование образца	Уравнение линейной регрессии $y=bx + a$	Критерий Стьюдента для коэф. b	Критерий Стьюдента для коэф. a	Критическое значение критерия Стьюдента	Критерий Фишера для сравнения линий в целом, F	Критическое значение F-критерия
ОСО	$y=1,6427x + 0,5$	$t = 0,0028$	$t = 0,21$	$t_{\text{крит}}=2,78$	$F = 0,15$	$F_{\text{крит}} = 5,14$
Раствор БСА	$y=1,6415x + 0,7$					

Полученные результаты позволили использовать ОСО для построения калибровочного графика при определении белка для метода Лоури в качестве ОСО содержания БСА с тем же аттестованным значением - 0,39 мг/мл.

Для оценки линейности использовали разные серии сыворотки преципитирующей белки сыворотки рогатого скота. В качестве показателя линейности рассчитали коэффициент корреляции, который в среднем составил 0,996, а коэффициент детерминации 0,991, что свидетельствует о сильной прямой зависимости концентрация БСА – высота «ракеты» для ОСО БСА в случае применения сыворотки против белков СРС (таблица 4).

Поскольку ОСО используется для построения калибровочного графика, оценили доверительную область объединенной линии регрессии по формулам [4,5,6] при доверительной вероятности 0,95. Неопределенность

калибровочного графика в диапазоне 0,5 – 2,0 мкг/мл составила в среднем 10%.

Вычисленные по формулам [7,8,9,10,11] предел обнаружения и предел количественного определения составили: ПО = 0,15 мкг/мл, ПКО = 0,5 мкг/мл БСА.

Таблица 4.

Коэффициент корреляции и коэффициент детерминации зависимости «Концентрация БСА – высота «ракеты», выявляемой методом РИЭФ, с использованием разных серий сыворотки против СРС.

Концентрация БСА, мкг/мл	Высота «ракеты» в зависимости от серии сыворотки против СРС, мм						
	Серия 2	Серия 2	Серия 2	Серия 17	Серия 4	Серия 4	Серия 4
0,25	1	--	--	--	--	--	--
0,5	1,6	2	1	1	5	4	4
1,0	2,1	3,5	2,2	2	9	8	6,5
1,5	3,0	5	3,5	--	--	--	--
2,0	4	6	5	3,5	14	11	11
Коэффициент корреляции	0,995	0,996	0,999	0,995	0,992	0,993	0,999
Коэффициент детерминации	0,990	0,992	0,998	0,990	0,984	0,986	0,998

Для оценки правильности оценили систематическую погрешность методики анализа и показатель правильности (верхней и нижней границы, в которых систематическая погрешность методики находится с доверительной вероятностью 0,95).

Погрешность методики оценивали по МИ 2336-2002 «Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки». Систематическую погрешность (Q) методики рассчитывали как разность между средним значением результатов анализа и аттестованным значением стандартного образца:

$$Q = \overline{X}_{cp} - C, [12]$$

где C - раствор БСА, разведенный до концентрации 2 мкг/мл.

Результаты расчета представлены в таблице 5.

Значимость вычисленных значений Q проверили по критерию Стьюдента.

Для этого рассчитали t - критерий по формуле:

$$t = \frac{|Q|}{\sqrt{S^2 + \frac{\Delta^2}{3}}}, \quad [13]$$

где Δ - погрешность аттестованного значения.

Таблица 5

Расчет систематической ошибки.

№ серии сыворотки против СРС	Значение «ОСО 2 мкг/мл» по калибровочному графику	Среднее арифметическое	Среднее средних арифметических	Дисперсия средних	Q
2	1,8; 1,8	1,8	1,88	0,016	0,12
2	2,0; 2,1	2,05			
2	1,8; 2	1,9			
17	1,7; 1,8	1,75			
4	1,8; 1,8	1,8			
4	1,9; 1,7	1,8			
4	2,0; 2,1	2,05			

Полученное значение t - критерия = 0,08 ниже табличного $t_{табл}=2,78$, найденного по таблице «Процентные точки распределения коэффициента Стьюдента» при доверительной вероятности 0,95 и числе степеней свободы $f = n - 1$. Таким образом, оценка систематической погрешности незначима на фоне случайного разброса. В этом случае ее принимают равной нулю.

Промежуточную прецизионность – показатель точности метода – вычисляли в соответствии с [МУ «Валидация методов контроля химических и физико-химических показателей качества МИБП: организация, порядок проведения и представления результатов.», МУ 3.3.2.1886-04, 2004] и с применением различных серий сыворотки против СРС и раствора БСА с концентрацией 2,0 мкг/мл. Предел промежуточной прецизионности $R_{пр}$ равен 0,33 мкг/мл. Таким образом, содержание БСА в исследуемом образ-

це должно быть менее 0,25 мкг/мл – нижней точки калибровочного графика.

4. Валидация ИФА тест-системы «Immunoenzymetric Assay for the Measurement of BSA», производства «Cygnus Technologies, Inc.», Cat.# F030, USA.

Валидация данной тест-системы заключалась в определении специфичности, линейности, предела обнаружения, предела количественного определения, диапазона определяемых величин и показателей точности тест-системы - правильности и промежуточной прецизионности.

Для проведения валидации использовали отраслевой стандартный образец содержания БСА с аттестованной характеристикой 0,39 мг/мл.

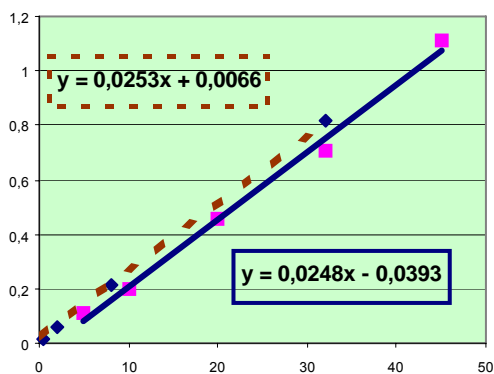
Для оценки специфичности использовали метод добавок. Добавляли 5, 10, и 20 нг БСА к паротитной вакцине (серии № 0328, 0329, 0330), 32 нг или 10 нг ОСО БСА к полуфабрикату паротитной вакцины (серии № 00115, 00116, 00117).

В среднем (по 5-ти определениям) для готовых серий паротитной вакцины процент выявления составил 99,6%, а для полуфабриката паротитной вакцины – 119,3%, таким образом, специфичность тест-системы, с учетом показателей точности, удовлетворительна.

Для оценки линейности с помощью программы Excel строили график зависимости «Концентрация БСА - оптическая плотность при 450 нм» с использованием стандартных образцов тест-системы (0,5-32 нг/мл), а также ОСО БСА (5-50 нг/мл) и проводили регрессионный анализ.

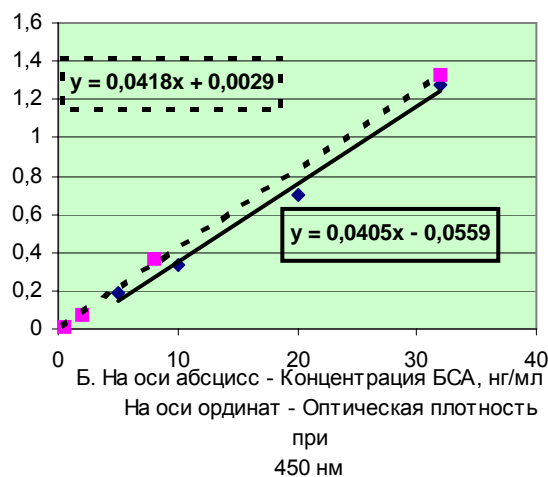
Коэффициент корреляции составил 0,997 - 0,999, а коэффициент детерминации 0,994 – 0,998. Полученные значения коэффициентов свидетельствуют о существовании линейной зависимости оптической плотности от концентрации БСА при использовании изучаемой тест-системы.

Кроме оценки коэффициентов корреляции и детерминации была проведена оценка параллелизма графиков зависимости «Концентрация БСА – оптическая плотность при 450 нм», полученных с применением калибраторов тест-системы и ОСО БСА с одной стороны и калибраторов тест-системы и исследуемого препарата с другой. В качестве исследуемого препарата использовали паротитную вакцину с добавками БСА 5,10 и 20 нг и полуфабрикат паротитной вакцины с добавкой 32нг. Результаты представлены на рисунке 5 (А,Б).



А. На оси абсцисс - Концентрация БСА, нг/мл
На оси ординат - Оптическая плотность при 450 нм

— Калибраторы тест-системы
— ОСО БСА



Б. На оси абсцисс - Концентрация БСА, нг/мл
На оси ординат - Оптическая плотность при 450 нм

— Паротитная вакцина и полуфабрикат паротитной вакцины с добавкой БСА (результаты определения № 1)
- - - Стандартные образцы тест-системы

Поскольку тест-система представляет собой количественный метод ИФА для определения БСА и включает набор стандартных образцов, используемых для построения калибровочного графика, помимо коэффициента корреляции мы сочли необходимым оценить неопределенность положения этого графика, для чего использовали формулы [4,5,6].

Для концентрации 0,5 нг/мл БСА (независимая переменная x) максимальный доверительный интервал при доверительной вероятности 0,95

для значения оптической плотности (зависимая переменная y) составил $\pm 0,03$, для концентрации 2,0 нг/мл - $\pm 0,032$; для концентрации 8,0 нг/мл $\pm 0,043$; для концентрации 32 нг/мл БСА $\pm 0,08$. Полученные результаты свидетельствуют о весьма незначительном разбросе значений, что позволяет при проведении расчетов пренебречь неопределенностью положения калибровочного графика.

Предел обнаружения и предел количественного определения, вычисленные по формулам [7,8,9,10,11] на основании стандартного отклонения для нулевой концентрации, колебался в пределах 0,24-1,83 нг/мл для ПО и 0,72-5,55 нг/мл для ПКО.

Полученные результаты несколько отличаются от данных производителя тест-системы, которые предполагают использование для количественного определения БСА калибровочного графика с нижней концентрацией 0,5 нг/мл, однако, применению данной тест-системы для выявления содержания остаточного количества БСА в паротитной вакцине и ее вирусных сборах не препятствуют, поскольку предельное допустимое содержание БСА в готовом препарате – 50 нг/мл – существенно выше установленных пределов.

Промежуточную прецизионность метода определяли для низких, средних и высоких концентраций БСА. Для определения промежуточной прецизионности метода в диапазоне низких концентраций использовали готовую форму паротитной вакцины (серии 0328, 0329, 0330); в диапазоне средних концентраций - полуфабрикат паротитной вакцины (серии 00115, 00116, 00117); в диапазоне высоких концентраций - полуфабрикат паротитной вакцины (серии №№ 00115, 00116, 00117) с добавлением 32 нг или 10 нг ОСО БСА (таблица 6).

Для оценки правильности применяли два метода, один из которых заключается в вычислении оценки систематической погрешности методики анализа и показателя правильности методики (верхнюю и нижнюю границы, в которых систематическая погрешность методики находится с доверительной вероятностью 0,95), а другой основан на методе добавок.

Таблица 6.

Расчет стандартного отклонения промежуточной прецизионности и предела промежуточной прецизионности с использованием калибровочного графика стандартных образцов тест-системы.

Диапазон концентраций	Образец	Содержание БСА, нг/мл					Дисперсия S_{ij}^2	$\sum S_{ij}^2$	Средневзвешенная дисперсия	Стандартное отклонение воспроизвод.	R, нг/мл
		Определение №1	Определение №2	Определение №3	Определение №4	Определение №5					
Низкие концентрации 0-10 нг/мл	Серия 0328	1,25	1,08	0,76	0,56	1,84	0,24	0,38	0,076	0,3	1,1
	Серия 0329	1,1	1,24	1,12	0,67	1,58	0,11				
	Серия 0330	1,27	1,5	1,27	1,7	1,47	0,03				
Средние концентрации 10-20 нг/мл	Серия 00115	12,4	12,6	12,2	9,2	9,27	3,0	21,1	4,22	2,1	8,1
	Серия 00116	20,7	26	22,06	19,9	17,5	9,9				
	Серия 00117	15,2	18,3	15,9	14,48	10,43	8,2				
Высокие концентрации 20-30 нг/мл	Серия 00115+ 10 нг БСА	22,26	27,6	22,84	19,2	19,4	11,6	75,4	15,08	3,9	15,3
	Серия 00116+ 10 нг БСА	31,7	40,9	31,02	28,7	26,1	54,7				
	Серия 00117+ 10 нг БСА	24,9	29,4	25,44	23,3	21,28	9,1				

Систематическая погрешность (Q) методики, рассчитанная по формуле [13] с применением калибровочного графика стандартных образцов, входящих с набор тест-системы, составила 3,8 нг/мл БСА, критерий

Стьюдента t , рассчитанный по формуле [14] составил 1,1, что меньше табличного значения этого критерия = 2,78. Таким образом, систематическая погрешность незначима на фоне случайного разброса.

При использовании метода добавок к паротитной вакцине добавляли 5, 10, 20 нг/мл БСА, а к полуфабрикату паротитной вакцины - 32 нг/мл БСА. По результатам анализа с помощью программы Excel строили график, для построения которого отмечали:

- на оси ОХ: ожидаемое (добавленное) количество БСА, нг/мл;
- на оси ОУ: измеренное количество БСА, нг/мл и находили уравнение линейной регрессии.

Подтверждением правильности является попадание начала координат $- 0$ в доверительный интервал коэффициента сдвига линии регрессии, а также попадание единицы в доверительный интервал коэффициента наклона b линии регрессии.

Доверительный интервал коэффициента сдвига (a) вычисляли по формуле:

$$a - t_{\alpha} S_A \leq \alpha \leq a + t_{\alpha} S_A$$

где S_A – стандартная ошибка коэффициента сдвига, которую рассчитывали по формуле [11].

Доверительный интервал для коэффициента сдвига составляет

$$-7,25 \leq a \leq 4,62 \text{ и включает начало координат } - 0.$$

Доверительный интервал коэффициента наклона (b) вычисляют по формуле:

$$b - t_{\alpha} S_b \leq \beta \leq b + t_{\alpha} S_b$$

где S_b – стандартная ошибка коэффициента наклона, которую рассчитывали по формуле [9].

Доверительный интервал коэффициента наклона составляет

$$0,67 < b < 1,27 \text{ и включает } 1.$$

Максимальный CV составил 13% для одной плашки, что несколько превышает CV, указанный для тест-системы (10%).

Полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительной правильности тест-системы.

ВЫВОДЫ

1. Установленные в результате валидации характеристики метода РИЭФ для определения Ви-антигена позволили:

- применять данный метод при количественной оценке содержания Ви-антигена в вакцине «Вианвак»;

- аттестовать два отраслевых стандартных образца содержания Ви-антигена;

- использовать в качестве ОСО содержания Ви-антигена серию вакцины «Вианвак» с содержанием Ви-антигена в более узких пределах, чем предусмотрено для готовой продукции.

2. Использование субстанции к аттестуемой серии и статистическая обработка результатов на основе регрессионного анализа делают возможной аттестацию ОСО Ви-антигена с привлечением двух лабораторий.

3. Установленные в результате валидации характеристики метода РИЭФ для определения БСА в культуральных вирусных вакцинах с использованием сыворотки, преципитирующей белки сыворотки рогатого скота позволили:

- использовать сыворотку против СРС для количественной оценки содержания БСА в культуральных вирусных вакцинах;

- аттестовать в качестве ОСО содержания БСА ОСО содержания белка для метода Лоури.

4. Установленные в результате валидации характеристики позволяют использовать тест-систему «Immunoenzymetric Assay for the Measurement of BSA» для контроля содержания остаточного количества БСА в паротитной вакцине и ее вирусных сборах.

5. На примере валидации иммунохимических методов предложен подход к валидации методик количественного анализа качества МИБП:

- для методов выявления количества основного компонента – оценка специфичности, линейности, рабочего диапазона, прецизионности и правильности;
- для методов выявления остаточных количеств примесей – оценка специфичности, линейности, предела обнаружения, предела количественного определения, прецизионности и правильности.

Список опубликованных печатных работ по теме диссертации

1. Устинникова О.Б., Волкова Р.А., Ванеева Н.П. «Аттестация отраслевого стандартного образца содержания Ви-антигена в брюшнотифозной вакцине». Первая Всероссийская конференция по вакцинологии «Медицинские иммунобиологические препараты для профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекций», М., 10-11 ноября 2004., Сборник тезисов, с.72-73.

2. Т.А.Бектимиров, Р.А.Волкова, Н.В.Медуницын, А.А.Мовсесянц, В.Г.Петухов, Т.М.Каргина, В.Ю. Гавриленкова, О.Б.Устинникова, В.И.Малкова, Е.В.Эльберт. Методические указания 3.3.2.1886-04 «Валидация методов контроля химических и физико-химических показателей качества МИБП: организация, порядок проведения и представления результатов», М.,2004.

3. Устинникова О.Б., Волкова Р.А., Ванеева Н.П. «К вопросу об аттестации отраслевого стандартного образца содержания Ви-антигена в брюшнотифозной вакцине». Научно-практический журнал «Биопрепараты», №1(17), М., 2005, с.24-26.
4. Устинникова О.Б., Волкова Р.А., Звонарев А.Ю., Кулякина М.Н. «К вопросу о валидации ИФА-тест-системы». Сборник тезисов Второй международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность», М., 2005, с.271.
5. Устинникова О.Б., Волкова Р.А., Звонарев А.Ю., Кулякина М.Н. «Применение ИФА тест-системы для определения БСА в препаратах вирусных сборов и вакцин коревой, паротитной и паротитно-коревой культуральных живых сухих». Сборник материалов конференции «Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний», Нижний Новгород, 2006, с.134.
6. Волкова Р.А., Устинникова О.Б., Звонарев А.Ю., Кулякина М.Н. «Валидация метода ИФА с использованием тест-системы «Immunoenzymetric assay for the measurement of BSA» для определения БСА в препаратах вирусных сборов и готовой продукции коревой, паротитной и паротитно-коревой вакцин». Тезисы «Вакцинология 2006. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней», 2006, с.29-30.
7. Устинникова О.Б., Волкова Р.А., Звонарев А.Ю., Кулякина М.Н. «Оценка характеристик метода определения содержания БСА в паротитной вакцине и вирусных сборах с помощью иммуноферментного анализа». Научно-практический журнал «Биопрепараты» №3(23)., М., 2006, с.24-27.