МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Испытание на анти-D антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека	ОФС.1.8.2.0004.15 Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод определения анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека. Анти-D антитела определяют методом гемагглютинации «на плоскости» (Метод А) или в геле (Метод В).

Принцип метода состоит в том, что содержащиеся в испытуемом препарате анти-D антитела, являясь иммуноглобулинами класса G, способны вызывать агглютинацию D-положительных эритроцитов.

Проведение испытания

Содержание анти-D антител определяют с использованием папаинизированных D-положительных эритроцитов человека группы крови I (0). Предпочтительно использование эритроцитов фенотипа $0R_2R_2$, возможно также применение эритроцитов фенотипов $0R_1R_1$ или $0R_1R_2$. Смешивание эритроцитов разных фенотипов недопустимо.

Для контроля специфичности анализа применяют D-отрицательные эритроциты фенотипа 0rr.

Допустимо применение как свежеприготовленной суспензии эритроцитов (при испытаниях методом гемагглютинации «на плоскости», Метод А), так и стандартных эритроцитов, входящих в тест-наборы (Методы А и В). При определении содержания анти-D-антител Методом А используют 3% суспензию эритроцитов, при определении содержания

гемагглютининов гелевым методом (Метод В) используют 0,8% суспензию эритроцитов.

Метод гемагглютинации «на плоскости» (Метод А)

В стеклянные пробирки или лунки планшета вносят равное количество соответствующего разведения препарата и 3% суспензии D-положительных эритроцитов человека группы крови I (0) – первый ряд и 3% суспензии D-отрицательных эритроцитов человека группы крови I (0) – второй ряд. К подготовленному разведению стандартного образца также добавляют равное количество 3% суспензии D-положительных эритроцитов человека группы крови 0 (первый ряд) и 3% суспензии D-отрицательных эритроцитов человека группы крови 0 (второй ряд). Пробы осторожно встряхивают (на шейкере) в течение 10 сек, затем центрифугируют в течение 1 мин при 80 об/мин. Пробирки (планшеты) располагают под углом 70° к горизонтальной поверхности и оценивают визуально агглютинацию эритроцитов через 4 – 5 мин (но не более чем через 10 мин).

Содержание анти-D антител, определяемое максимальным разведением препарата, при котором наблюдают агглютинацию любой интенсивности, сравнивают с содержанием анти-D антител в положительном стандартном образце.

Метод гемагглютинации в геле (Метод В)

Гелевый метод основан на использовании гелевой карты, представляющей собой пластиковый планшет с микропробирками, наполненными гелевыми колонками. Каждая микропробирка состоит из дозирующей/инкубационной камеры и колонки, содержащей полимеризованные микросферы декстрана в буферном растворе низкой ионной силы (LISS).

В дозирующую/инкубационную камеру микропробирки вносят по 1 капле 0,8 % суспензии стандартных D-положительных эритроцитов человека группы крови 0 (первый ряд) или по 1 капле 0,8% суспензии стандартных D-отрицательных эритроцитов человека группы крови 0 (второй ряд) и по

25,0 мкл соответствующего разведения испытуемого образца. Одновременно готовят пробы положительного и отрицательного стандартных образцов содержания анти-D антител: в дозирующую/инкубационную камеру микропробирки вносят по 1 капле 0,8% суспензии стандартных D-положительных эритроцитов человека группы крови 0 (первый ряд) или по 1 капле 0,8% суспензии стандартных D-отрицательных эритроцитов человека группы крови 0 (второй ряд) и по 25,0 мкл соответствующего разведения стандартного образца. Пробы инкубируют при температуре (37±0,5)°С в течение 30 мин. По окончании инкубации пробы центрифугируют (на специальной центрифуге для гелевых карт) в стандартных условиях (запрограммированный режим) и оценивают агглютинацию. Агглютинированные эритроциты распределяются в толще гелевой колонки или в ее верхней части. Неагглютинированные эритроциты оседают на дно микропробирки.

Содержание анти-D антител, определяемое максимальным разведением препарата, при котором наблюдают агглютинацию любой интенсивности, сравнивают с содержанием анти-D антител в положительном стандартном образце.

Критерии приемлемости результатов:

– в пробирках (планшетах, микропробирках), содержащих суспензию D-отрицательных эритроцитов человека, агглютинация должна отсутствовать. Наличие агглютинации в этих пробирках (планшетах, микропробирках) свидетельствует о неспецифической реакции; испытания в этом случае необходимо повторить;

– содержание анти-D антител в положительном стандартном образце должно соответствовать аттестованным величинам.

Примечания

1. Подготовка испытуемого образца. Испытуемый образец разводят фосфатным буферным раствором (pH 7,4±0,1), содержащим 2 г/л бычьего сывороточного альбумина, до содержания белка в образце 25 г/л. Это

разведение испытуемого образца принимают за двукратное разведение (1:2), даже если оно и не соответствует истинной кратности разведения.

Готовят два ряда двукратных разведений испытуемого образца с использованием фосфатного буферного раствора (pH 7,4±0,1), содержащего 2 г/л бычьего сывороточного альбумина (1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256). При использовании гелевого метода (Метод В) разведения испытуемого образца готовят с использованием 0,9% раствора натрия хлорида или буферного раствора низкой ионной силы (LISS).

2. Подготовка стандартных образцов содержания анти-D антител. В качестве стандартных образцов используют 5% раствор иммуноглобулина человека, содержащий 0,0475 МЕ/мл анти-D антител и имеющий номинальный титр в реакции гемагглютинации 1:8 (положительный стандартный образец) и 5% раствор иммуноглобулина человека, содержащий анти-D антитела в разведении не более 1:2 (отрицательный стандартный образец). Содержание анти-D антител в положительном стандартном образце является максимально допустимым для препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения. Подготовку стандартных образцов проводят в соответствии с инструкцией по применению. Анализ проводят с образцами, разведенными фосфатным буферным раствором (pH 7,4±0,1), содержащим 2 г/л бычьего сывороточного альбумина, до содержания белка 25 г/л.

3. Подготовка раствора папаина. Лиофилизат папаина растворяют в соответствии с инструкцией производителя. Инкубируют при температуре $(37\pm0,5)^0$С в течение 10–15 мин. Раствор используют свежеприготовленным. Возможно хранение раствора при температуре$(6\pm2)^0$С в течение 5 сут или при температуре минус (21±1)°С в течение 6 мес. Раствор после оттаивания повторному замораживанию не подлежит.

4. Подготовка суспензии стандартных эритроцитов. Свежеприготовленные D-положительные эритроциты (хранившиеся не более 3 сут), полученные не менее чем от 3 доноров, центрифугируют в течение 10 мин при 1500–2000 об/мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость сливают, осадок ресуспендируют в десятикратном объеме фосфатного буферного раствора и центрифугируют 10 мин при тех же условиях. Процедуру повторяют не менее 3 раз, до получения прозрачной надосадочной жидкости.

В стеклянную пробирку вносят равные объемы промытых эритроцитов и раствора папаина, инкубируют в течение 15 мин при температуре (37±0,5) ^{0}С, а затем центрифугируют при 1500–2000 об/мин в течение 10 мин. После удаления надосадочной жидкости осадок ресуспендируют в десятикратном объеме фосфатного буферного раствора и центрифугируют при тех же условиях.

Для приготовления 3% суспензии 1 объем осадка папаинизированных эритроцитов ресуспендируют в 32 объемах фосфатного буферного раствора, содержащего 2 г/л бычего сывороточного альбумина.

Аналогичным образом приготавливают 3% суспензию D-отрицательных эритроцитов, полученных от 1–3 доноров.

5. Приготовление фосфатного буферного раствора. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 8,0 г натрия хлорида, 0,76 г безводного натрия гидрофосфата, 0,2 г калия хлорида, 0,2 калия дигидрофосфата. Добавляют 900 мл воды очищенной. Доводят pH до 7,4±0,1 1М раствором натрия гироксида или 1 М раствором хлористоводородной кислоты, перемешивают, доводят объем раствора до метки водой очищенной и вновь перемешивают.