

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Определение анти-А и анти-В
гемагглютининов в лекарственных
препаратах иммуноглобулинов
человека**

ОФС.1.8.2.0005.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод, используемый для определения анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека.

Метод непрямой гемагглютинации «на плоскости» (Метод А) или гелевый метод (Метод В) основаны на том, что содержащиеся в испытуемом препарате анти-А и анти-В гемагглютинины, являясь неполными антителами класса Ig G, вызывают сенсibilизацию эритроцитов. Добавление антиглобулиновой сыворотки в солевой среде при температуре $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$ вызывает агглютинацию сенсibilизированных эритроцитов и позволяет визуализировать результат реакции.

Проведение испытания

Содержание гемагглютининов определяют с использованием эритроцитов человека групп крови A₁ (II), резус-отрицательный и В (III), резус-отрицательный. Допустимо применение как свежеприготовленной суспензии (при использовании метода непрямой гемагглютинации «на плоскости» (Метод А), так и стандартных эритроцитов, входящих в наборы для определения групп крови (при использовании Методов А и В).

При определении содержания гемагглютининов «на плоскости» (Метод А) используют 5% суспензию эритроцитов, при определении содержания гемагглютининов гелевым методом (Метод В) используют 0,8% суспензию эритроцитов.

Метод непрямой гемагглютинации «на плоскости» (Метод А)

В стеклянные пробирки или лунки планшета вносят равное количество соответствующего разведения испытуемого образца (ИО) и 5% суспензии эритроцитов человека группы крови А₁ (II) (первый ряд) и 5% суспензии эритроцитов человека группы крови В (III) (второй ряд). Пробы осторожно перемешивают и инкубируют в течение 30 мин при температуре (37±0,5)°С. По окончании инкубации пробы центрифугируют при 1500–2000 об/мин в течение 10 мин. Затем удаляют надосадочную жидкость, полученный осадок ресуспендируют в десятикратном объеме 0,9% раствора натрия хлорида и вновь центрифугируют при 1500–2000 об/мин в течение 10 мин. Процедуру повторяют не менее 3 раз. Надосадочную жидкость удаляют, добавляют равный осадку эритроцитов объем поливалентной антиглобулиновой сыворотки (сыворотка Кумбса) и осторожно перемешивают. Пробы инкубируют при температуре (37±0,5)°С в течение 30 мин. По окончании инкубации под микроскопом или визуально исследуют пробы, отмечая наличие агглютинации эритроцитов.

Титр гемагглютининов определяют как максимальное разведение испытуемого образца, при котором происходит агглютинация эритроцитов любой степени интенсивности. Разведение до содержания белка 30 г/л при определении титра не учитывают.

В каждую пробу, в которой не определяется агглютинация, вносят равное количество (по объему) контрольных клеток Кумбса, осторожно перемешивают и через 2–4 мин оценивают агглютинацию.

Критерии приемлемости результатов:

– в пробах с отрицательным результатом (отсутствие агглютинации) после добавления контрольных клеток Кумбса должна наблюдаться агглютинация.

Гелевый метод (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), смешанном с поливалентной антиглобулиновой сывороткой (сыворотка Кумбса).

В дозирующую/инкубационную камеру микропробирки вносят по 1 капле 0,8% суспензии стандартных эритроцитов человека группы крови A₁ (II) (первый ряд) и 0,8% суспензии эритроцитов человека группы крови B (III) (второй ряд) и по 25,0 мкл соответствующего разведения испытуемого образца (ИО). Пробы инкубируют при температуре (37±0,5)°C в течение 15 мин. По окончании инкубации пробы центрифугируют на специальной центрифуге (для гелевых карт) в стандартных условиях (запрограммированный режим) и оценивают агглютинацию.

Титр гемагглютининов определяют как максимальное разведение испытуемого образца, при котором наблюдают распределение агглютинированных эритроцитов в толще гелевой колонки или в её верхней части. Неагглютинированные эритроциты оседают на дно микропробирки. Разведение до содержания белка 30 г/л при определении титра не учитывают.

Примечания

1. Подготовка испытуемого образца. Испытуемый препарат разводят солевым раствором (0,9% раствор натрия хлорида или буферный раствор низкой ионной силы (LISS)) до содержания белка 30 г/л.

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

2. Подготовка суспензии стандартных эритроцитов. Эритроциты человека группы крови A₁ (II), резус-отрицательные (свежеприготовленные, не более 3 сут хранения) центрифугируют 10 мин при 1500–2000 об/мин при комнатной температуре, надосадочную жидкость сливают. Полученный осадок ресуспендируют в десятикратном объеме 0,9% раствора натрия хлорида и снова центрифугируют в течение 10 мин при 1500–2000 об/мин при комнатной температуре. Процедуру повторяют не менее 3 раз до

получения прозрачной надосадочной жидкости. Для получения 5% суспензии 1 объем осадка эритроцитов ресуспендируют в 19 объемах 0,9% раствора натрия хлорида.

Аналогичным образом приготавливают 5% суспензию эритроцитов человека группы крови В (III), резус-отрицательные.