

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Определение подлинности
препаратов аллергенов**

**ОФС.1.7.2.0034.15
Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод определения подлинности (выявления специфических аллергенных компонентов) препаратов аллергенов, представляющих собой водно-солевые экстракты, с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).

ОБЩАЯ ЧАСТЬ

Принцип твердофазного иммуноферментного метода анализа изложен в ОФС «Метод иммуноферментного анализа».

Исследуемый препарат сорбируют в лунках полистиролового планшета. На аллергосорбент наносят образцы специфических сывороток крови, содержащие специфические IgE-антитела к данному аллергену. В результате образуется комплекс антиген-антитело (АГ-АТ). К образовавшемуся в лунке планшета комплексу (АГ-АТ) добавляют конъюгат – моноклональные анти-IgE-антитела, меченные пероксидазой, и индикатор – тетраметилбензидин (ТМБ) в субстратном буфере. В лунках планшета с положительной реакцией проявляется цветное окрашивание.

Оптическую плотность растворов в лунках планшета оценивают фотометрическим методом.

Оценку уровня реакции осуществляют по показателям оптической плотности четырех разведений референс-сыворотки (1:1; 1:5; 1:25; 1:50, которые соответствуют 4, 3, 2 и 1 классу специфических IgE-антител.

Учет результатов реакции проводят с помощью референс-системы, состоящей из референс-аллергена (аллерген из пыльцы амброзии) и референс-сыворотки (сыворотка крови больных с содержанием IgE-антител к аллергену из пыльцы амброзии на уровне не менее 4 класса).

АЛЛЕРГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СЫВОРОТКИ (получение и оценка уровня IgE-антител)

Венозную кровь для получения аллергенспецифических сывороток получают от больных, страдающих аллергическими заболеваниями, с положительными кожными пробами, специфичность которых подтверждена. Пробы крови от каждого больного в количестве 10–15 мл отбирают в стерильные химические пробирки и помещают на 1 ч в термостат при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$, а затем на 16–18 ч в холодильник при температуре от 2 до 8 $^\circ\text{C}$.

Образовавшийся сгусток крови отделяют от стенок пробирок стеклянной палочкой. Сыворотку осторожно отделяют от сгустка. Если в сыворотке присутствуют примеси форменных элементов крови, их удаляют центрифугированием. Полученную сыворотку хранят при температуре от 2 до 8 $^\circ\text{C}$ в течение 5 дней или при температуре минус 40 $^\circ\text{C}$ до 1 года.

Уровень специфических IgE-антител оценивают с помощью набора реагентов для количественного определения специфических IgE-антител согласно инструкции по применению набора.

Для оценки подлинности препаратов применяют только сыворотки крови, содержащие аллергенспецифические антитела к исследуемым аллергенам на уровне 3-4 класса, которые далее используют в качестве положительного контроля.

Примечания.

МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

1. Испытуемый препарат – лекарственная форма аллергена или аллергоида.

2. Референс-аллерген – стандартный образец аллергена из пыльцы амброзии.
3. Референс-сыворотка – сыворотка крови от пациентов с амброзийным поллинозом, имеющая уровень специфических IgE-антител, соответствующий 4 классу.
4. Положительный контроль – аллергенспецифические сыворотки от пациентов с аллергическими заболеваниями, имеющие уровень специфических IgE-антител к исследуемому аллергену, соответствующий 3–4 классам.
5. Отрицательный контроль – сыворотка крови, не содержащая аллергенспецифических IgE-антител; также используется для разведения референс-сыворотки.
6. 0,05 М буферный раствор натрия карбоната – буферный раствор для сорбции.
7. Система тетраметилбензидин (ТМБ) – субстрат пероксидазы.
8. Конъюгат – мышинные моноклональные антитела к IgE человека, меченные пероксидазой, концентрированные.
9. Разводящий и промывающий раствор – фосфатно-солевой буферный раствор с твином 20 концентрированный (pH 7,1–7,3).
10. Стоп-реагент – 10 % раствор серной кислоты.
11. Вода очищенная.

ОБОРУДОВАНИЕ

1. Многоканальный фотометр вертикального сканирования для 96-луночных планшетов с длиной волны 450 нм.
2. Термостат (37 ± 1) °С.
3. Холодильник (8 ± 1) °С.
4. Автоматические или электронные дозаторы с переменным объемом (от 50 до 5000 мкл).
5. Прозрачные разборные 96-луночные планшеты с высокими сорбционными свойствами.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

1) 0,01 М буферный раствор натрия карбоната (pH 9,5). Смешивают 2 мл 0,05М раствора натрия карбоната с 8 мл воды очищенной. Полученный раствор используют на один планшет для ИФА. Хранят при температуре (8 ± 1) °С в течение 1 сут.

2) Раствор тетраметилбензидина (ТМБ). Смешивают 2,5 мл ТМБ пероксидазы субстрата с 2,5 мл раствора В пероксидазы субстрата (расходуют на один планшет для ИФА). Раствор готовят за 10 мин до внесения в планшет (хранению не подлежит).

3) Приготовление рабочих растворов реагентов (растворы №№ 1-2, растворы референс-сыворотки) – приведено в табл.1.

Таблица 1 – Приготовление рабочих растворов реагентов

Рабочие растворы	Приготовление (на 1 планшет)	Хранение
Разводящий и промывающий раствор (№1)	50 мл фосфатно-солевого буферного раствора концентрированного с твином довести до 500 мл водой очищенной (рН 7,2–7,4)	При температуре (8 ± 1) °С в течение суток
Раствор конъюгата (№2)	0,1 мл мышинных моноклональных антител к IgE человека концентрированных, меченных пероксидазой, довести до необходимой концентрации рабочим раствором № 1	Готовить непосредственно перед применением
• Раствор А (без разведения)	Растворы референс-сыворотки Референс-сыворотка с уровнем специфических IgE-антител 4 класса	При температуре (5 ± 1) °С в течение суток
• Раствор В (1:5)	К 0,1 мл раствора А добавляют 0,4 мл отрицательного контроля	-«-
• Раствор С (1:25)	К 0,05 мл раствора А добавляют 0,95 мл отрицательного контроля	-«-
• Раствор D (1:50)	К 0,05 мл раствора В добавляют 0,450 мл отрицательного контроля	-«-

МЕТОДИКА ОЦЕНКИ ПОДЛИННОСТИ ПРЕПАРАТОВ АЛЛЕРГЕНОВ

Подготовка аллергенов к сорбции. Испытуемый препарат и референс-аллерген амброзии с помощью буферного раствора для сорбции разводят до концентрации белкового азота, равной 1000 ± 250 PNU/мл.

Сорбция препаратов. Референс-аллерген в объеме 100 мкл вносят в первые два вертикальных ряда планшета. Во все лунки с 3 по 12 вертикальных рядов (стрипов) вносят растворы тестируемых аллергенов (или

аллергоидов) в объеме 100 мкл (по 1 стрипу на одну тестируемую серию препарата).

Планшет закрывают крышкой и инкубируют 16–18 ч при температуре (8 ± 1) °С.

После инкубации содержимое лунок планшета удаляют и промывают 3 раза промывающим и разводящим раствором (по 200 мкл на лунку).

Примечание.

Аллергоид тестируется параллельно на одном планшете с одноименным аллергеном. Количество стрипов с аллергеном и аллергоидом должно быть одинаковым. Микст-аллерген/аллергоид тестируется параллельно не менее чем с 3 аллергенами, входящими в его состав.

Методика проведения твердофазного ИФА

1. Во все лунки 1 вертикального ряда (контроль конъюгата) вносят по 100 мкл раствора № 1, в оставшиеся лунки остальных рядов – по 50 мкл этого же раствора.

2. Во 2 ряд вносят по 50 мкл растворов референс-сыворотки: в лунки А, В – раствор А; в лунки С, D – раствор В; в лунки Е, F – раствор С; в лунки G, H – раствор D.

3. В оставшиеся ряды вносят по 50 мкл положительного и отрицательного контролей: в лунки А–F – одноимённые положительные сыворотки к тестируемому препарату, в лунки G, H – сыворотку крови, не содержащую аллергенспецифических IgE- антител (отрицательный контроль).

4. Планшет закрывают крышкой и помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С на 1 ч.

5. После инкубации жидкость из лунок удаляют и в каждую лунку вносят по 200 мкл рабочего раствора № 1 (промывающий и разводящий раствор) на 2–3 мин, после чего жидкость вновь удаляют. Процедуру отмывки повторяют не менее 3 раз.

6. В каждую лунку планшета вносят по 100 мкл рабочего раствора № 2 (конъюгат) и помещают в термостат при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на 1 ч.

7. Отмывку планшета проводят согласно п. 5, повторив процедуру не менее 5 раз.

8. Во все лунки планшета вносят по 50 мкл раствора ТМБ. Планшет помещают в тёмное место и выдерживают в течение 15–20 мин при температуре $(23 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

9. Реакцию останавливают добавлением по 25 мкл стоп-реагента во все лунки и проводят учет результатов. В лунках, где прошла реакция, появится окрашивание разной степени интенсивности. Лунки первого ряда (контроль конъюгата) должны оставаться неокрашенными.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учёт результатов проводят фотометрически при длине волны 450 нм в течение 10 мин после остановки реакции. Вычисляют средние арифметические показатели оптической плотности (ОП) одноимённых лунок.

Критерии приемлемости результатов:

- среднее значение показателей ОП в лунках с контролем конъюгата (КК) не превышает 0,10 (визуально окрашивания лунок не видно);
- среднее значение показателей ОП в лунках с референс-сывороткой без разведения (А) больше 1,0, но меньше 2,5;
- соотношение средних показателей ОП с разведениями референс-сыворотки (растворы А, В, С, D) следующие: ОП раствора А > ОП раствора В > ОП раствора С > ОП раствора D;
- среднее значение показателей ОП раствора D в 1,5–2,0 раза больше среднего значения показателей ОП отрицательного контроля.

Рассчитывают уровень специфических IgE-антител в аллергенспецифических сыворотках (положительный контроль) (табл. 2).

Таблица 2 – Соответствие классов IgE-антител и показателей оптической плотности

Уровень специфических IgE-антител (классы)	Интервалы оптической плотности (ОП) растворов референс-сыворотки
4	От ОП лунок А и выше
3	От ОП лунок В до А
2	От ОП лунок С до В
1	От ОП лунок D до С
0	Меньше ОП лунок D

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аллерген следует считать подлинным (выявлены специфические аллергенные компоненты), если уровень IgE - антител в специфической сыворотке (положительный контроль) будет не менее 2 класса.

Аллергоид (модифицированный аллерген) следует считать подлинным (выявлены специфические аллергенные компоненты), если уровень IgE - антител в специфической сыворотке (положительный контроль) будет не менее 1 класса.

Пример: оценка подлинности аллергена из пыльцы полыни горькой и аллергоида пыльцевого полыни горькой.

Тестируемые препараты:

- аллерген из пыльцы полыни горькой (10000 PNU/мл);
- аллергоид пыльцевой полыни горькой (10000 PNU/мл).

Контрольные сыворотки:

- положительный контроль – сыворотка крови, содержащая специфические IgE-антитела к аллергену из пыльцы полыни горькой (уровень антител 3 класс);
- отрицательный контроль – сыворотка крови, не содержащая специфических IgE-антител к пыльце растений.

Последовательность проведения анализа

Приготовление рабочих растворов (раздел «Приготовление растворов»).

Аллерген из пыльцы полыни, аллергоид пыльцевой полыни горькой и референс-аллерген амброзии с помощью буферного раствора для сорбции разводят до концентрации белкового азота, равной 1000 ± 250 PNU/мл.

Референс-аллерген в объеме 100 мкл вносят в первые два вертикальных ряда планшета. В лунки вертикального ряда 3 вносят раствор аллергена из пыльцы полыни в объеме 100 мкл, ряда 4 вносят раствор аллергоида пыльцевого полыни в объеме 100 мкл (схема заполнения планшета приведена в табл. 3).

Таблица 3 – Схема заполнения планшета

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
<i>A</i>	КК	А	АС	АС								
<i>B</i>	КК	А	АС	АС								
<i>C</i>	КК	В	АС	АС								
<i>D</i>	КК	В	АС	АС								
<i>E</i>	КК	С	АС	АС								
<i>F</i>	КК	С	АС	АС								
<i>G</i>	КК	Д	ОС	ОС								
<i>H</i>	КК	Д	ОС	ОС								
	Референс-аллерген	Референс-аллерген	Аллерген полыни	Аллергоид полыни								

Примечание: 1,2,3,4 – ряды лунок планшета;

КК – контроль конъюгата - «холостая» проба;

А, В, С, D – растворы референс-сыворотки;

АС – аллерген-специфическая сыворотка (положительный контроль);

ОС – отрицательная сыворотка (отрицательный контроль);

Планшет закрывают крышкой и инкубируют 16–18 ч при температуре (8 ± 1) °С в холодильнике.

Во все лунки 1 вертикального ряда (контроль конъюгата) вносят по 100 мкл раствора № 1, в оставшиеся лунки остальных рядов – по 50 мкл этого же раствора.

Во 2 ряд вносят по 50 мкл растворов референс-сыворотки: в лунки А,

В – раствор А; в лунки С, D – раствор В; в лунки Е, F – раствор С; в лунки G, H – раствор D.

В ряды 3 и 4 вносят по 50 мкл положительного и отрицательного контроля: в лунки А–F – аллергенспецифическая сыворотка (АС), содержащая 3 класс IgE-антител к аллергену полыни, в лунки G,H – не содержащую IgE-антител сыворотку.

Планшет закрывают крышкой и помещают в термостат при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на 1 ч.

По истечении времени инкубации жидкость из лунок удаляют в емкость с дезинфицирующим раствором. В каждую лунку вносят по 200 мкл раствора № 1 на 2–3 мин, после чего жидкость вновь удаляют. Процедуру отмывки повторяют не менее 3 раз.

В каждую лунку планшета вносят по 100 мкл рабочего раствора №2 (конъюгат) и помещают в термостат при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на 1 ч.

Отмывку планшета проводят согласно п. 6, повторив процедуру не менее 5 раз.

Во все лунки планшета вносят по 50 мкл раствора ТМБ. Планшет помещают в тёмное место и выдерживают в течение 15-20 мин при температуре $(23 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента по 25 мкл во все лунки и проводят учет результатов. Время между остановкой реакции и учётом результатов не должно превышать 10 мин.

В лунках, в которых прошла реакция, должно появиться окрашивание разной степени интенсивности. Лунки первого ряда (контроль конъюгата) должны оставаться неокрашенными.

Учёт результатов

Учёт результатов проводят фотометрически при длине волны 450 нм.

Вычисляют средние арифметические показателей оптической плотности (ОП) одноимённых лунок и заполняют по табл. 4.

Таблица 4 – Результаты анализа

	Показатели ОП	Уровень специфических IgE - антител (классы)
Растворы референс-сыворотки		
А	1,99±0,35	4
В	1,09±0,22	3
С	0,56±0,21	2
D	0,29±0,14	1
Отрицательный контроль	0,08±,00	0
Положительный контроль (аллерген)	1,1±0,15	3
Положительный контроль (аллергоид)	0,89±0,17	2

Аллерген из пыльцы полыни горькой и аллергоид пыльцевой полыни горькой считаются подлинными (выявлены специфические аллергенные компоненты, присутствующие в тестируемых препаратах).