2.1.11.39. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИ-А И АНТИ-В ГЕМАГГЛЮТИНИНОВ

В общей фармакопейной статье представлены методы непрямой гемагглютинации (метод 1) и прямой гемагглютинации (метод 2), используемые для определения анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных средствах из плазмы крови.

МЕТОД 1. НЕПРЯМАЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИЯ

Методику 1 используют для лекарственных средств из плазмы крови; методику 2 используют только для лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека.

МЕТОДИКА 1

Готовят два ряда серий разведений испытуемого образца в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р*. К каждому разведению одного ряда прибавляют равный объём 5 % (*об/об*) суспензии *D*-отрицательных эритроцитов группы A_1 (фенотип A_1rr), предварительно трижды промытых раствором 9 г/л *натрия хлорида Р*. К каждому разведению другого ряда прибавляют равный объём 5 % (*об/об*) суспензии *D*-отрицательных эритроцитов группы *B* (фенотип *Brr*), предварительно трижды промытых раствором 9 г/л *натрия хлорида Р*. Инкубируют суспензии при температуре 37 °С в течение 30 мин, затем клетки трижды промывают раствором 9 г/л *натрия хлорида Р* центрифугированием. К клеткам прибавляют поливалентную антиглобулиновую сыворотку (сыворотку Кумбса) и выдерживают 30 мин. Не центрифугируя исследуют под микроскопом на агглютинацию эритроцитов.

МЕТОДИКА 2

Методика основана на использовании гелевой технологии, сочетающей методы непрямой гемагглютинации и гель-фильтрации.

В качестве стандартных образцов могут быть использованы соответственно *СО ФЕАЭС иммуноглобулина (испытание на анти-А и анти-В антитела, положительный контроль)* и *СО ФЕАЭС иммуноглобулина (испытание на анти-А и анти-В антитела, отрицательный контроль)* (для метода непрямой гемагглютинации). При необходимости проводят дополнительное испытание с *СО ФЕАЭС иммуноглобулина (испытание на анти-А и анти-В антитела, предельное содержание).*

Испытуемый раствор. Испытуемый образец разбавляют раствором 9 г/л *натрия хлорида Р* или буферным раствором низкой ионной силы (Low Ionic Strength Solution, LISS) до концентрации белка 30 г/л.

Растворы сравнения. Стандартные образцы (при необходимости после восстановления) разбавляют раствором 9 г/л *натрия хлорида Р* или буферным раствором низкой ионной силы до концентрации белка 30 г/л.

Эритроциты. Коммерчески доступные 0,8 % (*об/об*) суспензии эритроцитов группы крови A_1 и 0,8 % (*об/об*) суспензии эритроцитов группы крови *B*.

Пластиковые карты («гелевые карты»). Пластиковые карты с встроенными микропробирками, которые содержат полимеризованные микросферы декстрана в буферном растворе низкой ионной силы, смешанном с поливалентной антиглобулиновой сывороткой (сыворотка Кумбса).

Готовят два ряда по семь последовательных двукратных разведений испытуемого раствора и два ряда по семь последовательных двукратных разведений для каждого раствора сравнения.

В дозирующую (инкубационную) камеру микропробирок одного ряда помещают по одной капле 0,8 % (*об/об*) суспензии эритроцитов группы A_1, другого ряда – по одной капле 0,8 % (*об/об*) суспензии эритроцитов группы *B*. Прибавляют по 25 мкл соответствующих разведений растворов сравнения (для положительного и отрицательного контролей) и испытуемого раствора.

Инкубируют при температуре 37 °С в течение 15 мин. По окончании инкубации центрифугируют в стандартных условиях.

Содержание 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 концентрации белка 30 г/л при определении титра не учитывают.

Содержание гемагглютининов в стандартном образце должно соответствовать аттестованным значениям.

Если номинальный титр анти-А и анти-В гемагглютининов испытуемого образца больше, чем титр положительного контроля, испытуемый образец сравнивают со *СО ФЕАЭС иммуноглобулина (испытание на анти-А и анти-В антитела, предельное содержание).* Разведение до содержания белка 30 г/л при определении титра не учитывают.

Максимально допустимый титр 32 (положительный результат отмечается в разведении 1:32).

МЕТОД 2. МЕТОД ПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

*Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ)***.** Растворяют в *воде Р* 8,0 г *натрия хлорида Р*, 0,76 г *натрия гидрофосфата безводного Р*, 0,2 г *калия хлорида Р* и 0,2 г *калия гидрофосфата Р* и доводят объём раствора до 1000 мл тем же растворителем. Если полученный раствор необходимо хранить в течение нескольких дней, прибавляют 0,2 г *натрия азида Р* с целью предотвращения микробной контаминации.

Фосфатно-солевой буферный раствор, содержащий альбумин бычий (ФСБ-БСА). Растворяют в ФСБ 2 г *альбумина бычьего Р* и доводят объём раствора до 1000 мл тем же растворителем. Раствор хранят при температуре от 2 °С до 8 °С, перед применением нагревают до температуры от 19 °С до 25 °С.

Раствор папаина. Для получения раствора используют подходящий серологически чистый *папаин Р* с подтвержденной активностью, коммерчески доступный.

Эритроциты, обработанные папаином. Используют объединённые D-отрицательные эритроциты группы A_1 (фенотип A_1rr), *D*-отрицательные эритроциты группы *B* (фенотип *Brr*) и *D*-отрицательные эритроциты группы *O* (фенотип *Orr*), полученные предпочтительно от трёх доноров для каждого фенотипа. При использовании *СО ФЕАЭС иммуноглобулина (испытание на анти-А и анти-В антитела, предельное содержание)*, необходимы эритроциты, полученные от трёх доноров. Эритроциты группы A_2rr не используют, так как реакция гемагглютинации с ними более слабая.

Клетки промывают ФСБ четыре раза или до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной. Каждый раз клетки суспендируют не менее чем в двух объёмах ФСБ, центрифугируют при 1800 g в течение 5 мин, надосадочную жидкость удаляют. Сконцентрированные клетки обрабатывают раствором папаина в соответствии с инструкцией производителя и промывают четыре раза ФСБ.

Эритроциты, обработанные папаином, хранят не более семи суток в консервирующем растворе при температуре от 2 °С до 8 °С. Состав пригодного консервирующего раствора:

Натрия цитрат	8 г/л
D-глюкоза	20 г/л
Лимонная кислота	0,5 г/л
Натрия хлорид	4,2 г/л
Инозин	0,938 г/л
Аденозинтрифосфат (АТФ)	0,4 г/л
Хлорамфеникол	0,34 г/л

Неомицина сульфат	0,1 г/л

Перед использованием клетки, обработанные папаином, промывают не менее двух раз в ФСБ или до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной.

Микропланшеты. Микропланшеты с V-образными формами лунок и несвязывающей (инертной) поверхностью.

Стандартные образцы. В качестве стандартных образцов могут быть использованы соответственно *СО ФЕАЭС иммуноглобулина (испытание на анти-А и анти-В антитела, положительный контроль)* и *СО ФЕАЭС иммуноглобулина (испытание на анти-А и анти-В антитела, отрицательный контроль)* для положительного и отрицательного контролей (для метода прямой гемагглютинации). *СО ФЕАЭС иммуноглобулина (испытание на анти-А и анти-В антитела, предельное содержание)* используют для определения максимально допустимого содержания в сериях лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека, которые имеют титры больше, чем титр положительного контроля.

МЕТОДИКА

Используют для лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека.

Методику выполняют при температуре от 15 °С до 25 °С с использованием растворов сравнения и испытуемых растворов в одно и то же время и в одних и тех же условиях.

При необходимости проводят дополнительное испытание с *СО ФЕАЭС иммуноглобулина (испытание на анти-А и анти-В антитела, предельное содержание).*

Растворы сравнения. Стандартные образцы для положительного и отрицательного контролей при необходимости восстанавливают в соответствии с рекомендациями производителя. В каждом из восстановленных стандартных образцов концентрация иммуноглобулина *G* (*IgG*) составляет 50 г/л. Для получения раствора, содержащего *IgG* в концентрации 25 г/л, с помощью ФСБ-БСА выполняют двукратное разведение каждого восстановленного стандартного образца или выполняют подходящее разведение стандартного образца в соответствии с инструкцией по применению.

Готовят по семь последовательных двукратных разведений для каждого раствора сравнения с помощью ФСБ-БСА для получения разведений до 1:256 (0,195 г/л *IgG*). Помещают по 20 мкл каждого разведения каждого раствора сравнения в микропланшет для титрования в трёх повторностях.

Испытуемые растворы. Испытуемый образец разводят с помощью ФСБ-БСА для получения начальной концентрации IgG 25 г/л. Для испытуемых образцов с концентрацией 50 г/л используют двукратное разведение; корректируют степень разведения испытуемых образцов, концентрация иммуноглобулина в которых отличается от 50 г/л, таким образом, чтобы начальная концентрация иммуноглобулина в испытуемом образце составляла 25 г/л. Раствору испытуемого образца с концентрацией IgG 25 г/л присваивают номинальное двукратное разведение (1:2), даже если оно не отражает используемую кратность разведения. Готовят по семь последовательных двукратных разведений с помощью ФСБ-БСА для получения разведений до 1:256 (0,195 г/л *IgG*) в одинаковом диапазоне концентраций *IgG* растворами сравнения. Помещают по 20 мкл каждого полученного разведения в микропланшет в трёх повторностях.

Испытуемые образцы с концентрацией IgG ниже 25 г/л разводят до исходной концентрации, соответствующей ближайшей более низкой концентрации стандартных растворов; раствору испытуемого образца присваивается то же номинальное разведение, что и соответствующему раствору сравнения с такой же концентрацией *IgG.* Готовят соответствующие серии двукратных разведений в соотношении 1:2, как описано выше.

Готовят 3 % (*об/об*) суспензию из *D*-отрицательных A_1, *B* и *O* эритроцитов, обработанных папаином, используя для разведения ФСБ-БСА. Прибавляют по 20 мкл *D*-отрицательных A_1, *B* и *O* эритроцитов к соответствующему ряду разведений каждого

испытуемого раствора и растворов сравнения (для положительного и отрицательного контролей). Содержимое планшетов перемешивают путём встряхивания в шейкере в течение 10 с или до ресуспендирования эритроцитов.

Центрифугируют при 80 g в течение 1 мин. Планшет располагают под углом приблизительно 70 °. Результаты оценивают не ранее чем через 4 мин или при установлении отрицательного результата в лунках с отрицательным контролем и с эритроцитами фенотипа *0rr.* Агглютинацию в виде «кнопки» на дне лунки расценивают как положительный результат; клетки, стекающие по поверхности лунки, - как отрицательный результат. За конечную точку титрования принимают наибольшее разведение, при котором отмечается положительный результат.

Содержание гемагглютининов в стандартном образце должно соответствовать аттестованным значениям, в противном случае необходимо провести проверку качества реактивов и условий испытания, например нарушений по температуре использованных реагентов (буферные растворы были не подходящей температуры), недостаточное время для оценки результатов.

Если номинальный титр анти-А и анти-В гемагглютининов испытуемого образца больше, чем титр положительного контроля, испытуемый образец сравнивают со *СО ФЕАЭС иммуноглобулина (испытание на анти-А и анти-В антитела, предельное содержание).*

Максимально допустимый титр 64 (положительный результат отмечается в разведении 1:64).