

### 2.1.11.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРЕДЕЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ АНТИ-D ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

В настоящей общей фармакопейной статье представлена методика определения примеси анти-D антител в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека.

*Данная методика выполняется при температуре от 15 °С до 25 °С с использованием стандартных растворов и испытуемых растворов в одно и то же время и в одних и тех же условиях.*

Предварительно готовят следующие реактивы и материалы:

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

*Раствор папаина.* Используют коммерчески доступный серологически чистый папаин, активность которого подтверждена.

*Эритроциты, обработанные папаином.* Готовят из пула D-положительных эритроцитов от не менее трех доноров, предпочтительно группы 0R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>. D-положительные эритроциты могут также быть получены от доноров с группой крови 0R<sub>1</sub>R<sub>1</sub> или 0R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>. Смешение эритроцитов различных групп крови не оценивалось, поэтому не рекомендуется.

D-отрицательные эритроциты, обработанные папаином готовят из пула D-отрицательных эритроцитов, предпочтительно от трех доноров группы 0гг. Если доступен только один донор группы 0гг, допустимо использовать D-отрицательные эритроциты только одного донора.

Клетки промывают ФСБ четыре раза или до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной. Клетки центрифугируют при 1800 *g* в течение 5 мин, надосадочную жидкость удаляют. Сконцентрированные клетки обрабатывают раствором папаина в соответствии с инструкциями производителя.

Эритроциты, обработанные папаином, хранят не более 1 недели в консервирующем растворе. Состав пригодного консервирующего раствора:

Натрия цитрат	8 г/л
D-глюкоза	20 г/л
Кислота лимонная	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

*Микропланшеты.* Жесткие микропланшеты с V-образными формами лунок.

*Стандартные образцы.* В качестве стандартных образцов могут быть использованы соответственно СО ФЕАЭС иммуноглобулина (испытание на анти-D иммуноглобулин человека) с номинальным титром 8 и СО ФЕАЭС иммуноглобулина (испытание на анти-D иммуноглобулин человека, отрицательный контроль) с титром <2.

### МЕТОДИКА

*Стандартные растворы.* Стандартные образцы для положительного и отрицательного контролей восстанавливают в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрация иммуноглобулина G (IgG) составляет 50 г/л в каждом из восстановленных стандартных образцов. Для получения раствора, содержащего IgG в концентрации 25 г/л, выполняют двукратное разведение каждого восстановленного стандартного образца с помощью ФСБ, содержащего альбумин бычий Р в концентрации 2 г/л.

Готовят по 7 последовательных двукратных разведений для каждого восстановленного стандартного образца с помощью ФСБ, содержащего альбумин бычий Р в концентрации 2 г/л, для получения разведений до 1:256 (0,195 г/л IgG). Помещают 20 мкл каждого разведения каждого стандартного образца в микропланшет для титрования в двух повторностях.

*Испытуемые растворы.* Испытуемый образец разводят с помощью ФСБ, содержащего альбумин бычий Р в концентрации 2 г/л, 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. Такому исходному 25 г/л раствору испытуемого образца присваивается номинальное двукратное разведение (1:2) для сравнения со стандартными растворами, даже если это не отражает истинную кратность разведения, использованную для получения концентрации 25 г/л. Готовят по 7 последовательных двукратных разведений для каждого испытуемого образца с помощью ФСБ, содержащего альбумин бычий Р в концентрации 2 г/л, для получения разведений до 1:256 (0,195 г/л IgG) в одинаковом диапазоне концентраций IgG со стандартными растворами. Помещают по 20 мкл каждого полученного разведения в микропланшет для титрования в двух

повторностях.

Готовят 3 % (об/об) суспензию из D-положительных и D-отрицательных эритроцитов, обработанных папаином, используя для разведения ФСБ, содержащий *альбумин бычий Р* в концентрации 2 г/л. Прибавляют по 20 мкл полученной 3 % (об/об) суспензии D-положительных эритроцитов к одному ряду разведений каждого испытуемого образца, стандартных образцов для положительного и отрицательного контролей и по 20 мкл полученной 3 % (об/об) суспензии D-отрицательных эритроцитов к другому ряду разведений каждого испытуемого образца и стандартных образцов (для положительного и отрицательного контролей). Содержимое планшетов перемешивают путем встряхивания в шейкере в течение 10 с.

Центрифугируют при 80 g в течение 1 мин. Планшет располагают под углом приблизительно 70°. Снимают показания не ранее чем через 4 мин. Агглютинация в виде «кнопки» на дне лунки свидетельствует о положительном результате. Клетки, стекающие по поверхности лунки, свидетельствуют об отрицательном результате. За конечную точку титрования принимается наибольшее разведение, при котором отмечается положительный результат.

Положительный контроль должен иметь номинальный титр 8 (положительный результат отмечается в разведении 1:8). В отрицательном контроле не должно наблюдаться агглютинации в разведении 1:2, в противном случае необходимо провести проверку качества реактивов и условий испытания.

Титр испытуемого образца не должен превышать титр стандартного образца для положительного контроля при условии, что их начальная концентрация составляла 25 г/л.