**Определение анти-А и анти-В ОФС**

**гемагглютининов в**

**лекарственных препаратах из**

**плазмы крови человека Вводится взамен ОФС.1.8.2.0005.15**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы непрямой гемагглютинации и прямой гемагглютинации, используемые для определения анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах из плазмы крови человека.

Метод непрямой гемагглютинации основан на том, что содержащиеся в испытуемом препарате анти-А и анти-В гемагглютинины сенсибилизируют эритроциты. Добавление антиглобулиновой сыворотки вызывает их агглютинацию, которую оценивают визуально.

Метод прямой гемагглютинации основан на том, что содержащиеся в испытуемом препарате анти-А и анти-В гемагглютинины вызывают агглютинацию обработанных папаином эритроцитов, которую оценивают визуально.

***Проведение испытания***

Содержание гемагглютининов определяют с использованием эритроцитов человека групп крови А (II), подгруппа А1, резус-отрицательный и В (III), резус-отрицательный. Допустимо применение как свежеприготовленной суспензии, так и стандартных эритроцитов, входящих в наборы для определения групп крови.

**Метод непрямой гемагглютинации (Способ А)**

В стеклянные пробирки или лунки планшета вносят равные объемы соответствующих разведений положительного и отрицательного стандартных образцов содержания анти-А и анти-В гемагглютининов (СО) (по два ряда), испытуемого образца (ИО) (по два ряда) и 5 % суспензии эритроцитов человека группы крови А (II), подгруппа А1 (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.

Содержание гемагглютининов определяют как максимальное разведение ИО, 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) стандартных или свежеприготовленных контрольных клеток Кумбса, осторожно перемешивают и через 5-10 мин оценивают агглютинацию.

*Критерии приемлемости результатов:*

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

− содержание гемагглютининов в СО должно соответствовать аттестованным величинам.

**Метод непрямой гемагглютинации в геле (Способ В)**

Метод основан на использовании гелевых карт, представляющих собой пластиковые планшеты с микропробирками, наполненными гелем. 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 А (II), подгруппа А1 (первый ряд) и 0,8 % суспензии эритроцитов человека группы крови В (III) (второй ряд) и по 25,0 мкл соответствующих разведений положительного и отрицательного стандартных образцов содержания анти-А и анти-В гемагглютининов (СО) и испытуемого образца (ИО).

Пробы инкубируют при температуре (37±0,5) °С в течение 15 мин. По окончании инкубации пробы центрифугируют на специальной центрифуге для гелевых карт в стандартных запрограммированных условиях.

Содержание гемагглютининов определяют как максимальное разведение ИО, 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.

*Критерии приемлемости результатов:*

− содержание гемагглютининов в СО должно соответствовать аттестованным величинам.

В случае если содержание анти-А и/или анти-В гемагглютининов в ИО превышает содержание анти-А и/или анти-В гемагглютининов в положительном СО, проводят повторное испытание в аналогичных условиях соответствующего способа с использованием СО лимита содержания анти-А и/или анти-В гемагглютининов. Содержание гемагглютининов в ИО не должно превышать таковой в СО лимита содержания анти-А и/или анти-В гемагглютининов. 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 (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128).

2. Подготовка СО содержания анти-А и анти-В гемагглютининов.

Подготовку СО проводят в соответствии с инструкцией по применению. Разводят СО 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 СО: 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128 (положительный, лимита содержания) и 1:2; 1:4 (отрицательный).

3. Подготовка суспензии стандартных эритроцитов. Эритроциты человека группы крови А1 (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.

4. Методика приготовления контрольных клеток Кумбса. Контрольные клетки Кумбса представляют собой эритроциты человека группы крови 0 (I), резус-положительные, сенсибилизированные антирезусным иммуноглобулином G (анти-D антителами).

Эритроциты человека группы крови 0 (I), резус-положительные (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. В пробирку вносят 1 объем осадка отмытых эритроцитов, добавляют равный объем антирезусного иммуноглобулина или реагента, содержащего моноклональные анти-D (антирезусные) антитела, в титре 1:4. Смесь перемешивают и инкубируют при температуре (37±0,5) °С в течение 30 мин. В случае, если произошла агглютинация процедуру повторяют, используя более разбавленный антирезусный иммуноглобулин или реагент, содержащий моноклональные анти-D (антирезусные) антитела. После инкубации сенсибилизированные эритроциты отмывают не менее 3 раз в 0,9 % растворе натрия хлорида до получения прозрачной надосадочной жидкости.

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

Для оценки пригодности контрольных клеток Кумбса в пробирку вносят 1 объем антиглобулиновой сыворотки (сыворотки Кумбса) и 2 объема 5 % суспензии сенсибилизированных эритроцитов, осторожно перемешивают и через 5-10 мин оценивают агглютинацию.

При отсутствии агглютинации необходимо повторить процедуру сенсибилизации резус-положительных эритроцитов группы крови 0 (I) менее разбавленным антирезусным иммуноглобулином или реагентом, содержащим моноклональные анти-D (антирезусные) антитела.

**Метод прямой гемагглютинации (Способ С)**

В стеклянные пробирки или лунки планшета вносят равные объемы соответствующих разведений положительного и отрицательного стандартных образцов содержания анти-А и анти-В гемагглютининов (СО) (по два ряда), испытуемого образца (ИО) (по два ряда) и 3 % суспензии эритроцитов человека группы крови А (II), подгруппа А1 (первый ряд) и 3 % суспензии эритроцитов человека группы крови В (III) (второй ряд). Пробы осторожно встряхивают (на шейкере) в течение 10 сек, затем центрифугируют в течение 1 мин при 180-200 об/мин. Пробирки (планшеты) располагают под углом 70 ° и оценивают визуально агглютинацию через 4 – 5 мин (но не более чем через 10 мин).

Содержание гемагглютининов определяют как максимальное разведение ИО, при котором происходит агглютинация эритроцитов любой степени интенсивности.

*Критерии приемлемости результатов:*

− содержание гемагглютининов в СО должно соответствовать аттестованным величинам.

В случае если содержание анти-А и/или анти-В гемагглютининов в ИО превышает содержание анти-А и/или анти-В гемагглютининов в положительном СО, проводят повторное испытание в аналогичных условиях с использованием СО лимита содержания анти-А и/или анти-В гемагглютининов. Содержание гемагглютининов в ИО не должен превышать таковой в СО лимита содержания анти-А и/или анти-В гемагглютининов.

**Примечания:**

1.Подготовка испытуемого образца. Испытуемый образец разводят фосфатным буферным раствором, рН 7,4±0,1, содержащим 2 г/л бычьего сывороточного альбумина, до содержания белка в образце 25 г/л. Это разведение вне зависимости от исходного содержания белка в испытуемом образце считают разведением 1:2

Готовят два ряда двукратных разведений препарата с использованием фосфатного буферного раствора, рН 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).

2.Подготовка СО содержания анти-А и анти-В гемагглютининов.

Подготовку СО проводят в соответствии с инструкцией по применению. Разводят СО фосфатным буферным раствором, рН 7,4±0,1, содержащим 2 г/л бычьего сывороточного альбумина, до содержания белка 25 г/л. Это разведение вне зависимости от исходного содержания белка в СО считают разведением 1:2.

Готовят два ряда дальнейших двукратных разведений СО: 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128 (положительный, лимита содержания) и 1:4 (отрицательный).

3.Подготовка раствора папаина. Лиофилизат растворяют в соответствии с инструкцией производителя. Инкубируют при температуре (37,0±0,5) 0С в течение 10–15 мин. Раствор используют свежеприготовленным. Возможно хранение раствора при температуре (6±2) 0С в течение 5 дней или при температуре минус (21±1) °С в течение 6 месяцев. Раствор после оттаивания повторному замораживанию не подлежит.

4. Подготовка суспензии стандартных эритроцитов. Эритроциты человека группы крови А1(II), резус-отрицательные (свежеприготовленные, не более 3 сут хранения, полученные от 1 – 3 доноров) центрифугируют 10 мин при 1500–2000 об/мин при комнатной температуре (20±5) °С, 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 (20±5) °С. Процедуру повторяют не менее 3 раз до получения прозрачной надосадочной жидкости.

В стеклянную пробирку вносят равные объемы промытых эритроцитов и приготовленного по примеру 7 раствора папаина, инкубируют в течение 15 мин при температуре (37±0,5) °С, а затем центрифугируют при 1500–2000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре (20±5) °С, 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 эритроцитов, обработанных папаином, ресуспендируют в 32 объемах фосфатного буферного раствора, содержащего 2 г/л бычьего сывороточного альбумина. Возможно хранение суспензии эритроцитов при температуре (5±3) °С в течение 7 сут.

Аналогичным образом приготавливают эритроциты человека группы крови В(III), резус-отрицательные (свежеприготовленные, не более 3 сут хранения, полученные 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 рН до 7,4±0,1 1 М раствором натрия гироксида или 1 М раствором хлористоводородной кислоты, перемешивают и доводят объем раствора до метки водой очищенной, и вновь перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 3 мес.