**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**Иммуноглобулин человека ФС**

**антирезус Rho(D), лиофилизат**

 **для приготовления раствора для**

**внутримышечного введения Взамен ФС 42-2437-96**

 Настоящая фармакопейная статья распространяется на иммуноглобулин человека антирезус Rho(D), лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения. Препарат представляет собой иммунологически активную белковую фракцию, содержащую преимущественно антирезус Rho(D) антитела иммуноглобулины G (IgG) и может содержать незначительное количество антител к другим групповым антигенам эритроцитов человека.

 Препарат не содержит консервантов и антибиотиков.

 ПРОИЗВОДСТВО

Для производства препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rho(D), лиофилизатов для приготовления раствора для внутримышечного введения используется плазма крови доноров с достаточным титром ранее приобретенных анти D-антител или из плазмы крови доноров, иммунизированных D–положительными эритроцитами, соответствующая требованиям ФС «Плазма человека для фракционирования».

Требования, предъявляемые к иммунизации доноров, устанавливаются уполномоченным органом в соответствии с требованиями действующих нормативных правовых актов. Для производства препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rho(D) обязательным является определение содержания ДНК парвовируса В19 в пуле плазмы молекулярно-биологическими методами (методами амплификации нуклеиновых кислот); предельное содержание ДНК парвовируса В19 не должно превышать 10 МЕ/мл.

Производство препарата должно осуществляться с соблюдением требований, указанных в ОФС «Иммуноглобулины человека», ОФС «Иммуноглобулин человека нормальный».

 ИСПЫТАНИЯ

**Описание.** Лиофилизат белого или светло желтого цвета.

Восстановленный препарат – опалесцирующий бесцветный или светло – желтый раствор. Определение проводят визуально.

**Подлинность (видоспецифичность).** Подтверждается наличием белков только сыворотки крови человека. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле». Допустимо проведение испытания методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Иммунодиффузия в геле». В результате испытания должны выявляться линии преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови человека.

**Прозрачность.** Не должен превышать эталон сравнения № I. Определение проводят в соответствии с ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей» или показатель оптической плотности должен быть не более 0,05. Определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 540 нм.

**Цветность.** Должен быть бесцветным или светло- желтой окраски, не превышающей интенсивность окраски эталонного раствора Y6 (определение проводят в соответствии с ОФС «Степень окраски жидкостей») или раствор с оптической плотностью не более 0,15 (для препаратов для подкожного и внутримышечного введения) (определение проводят в соответствии с ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» в кюветах с толщиной слоя 3 мм при длине волны 400 нм).

**Время растворения.** Не белее 20 мин. Определение проводят в соответствии с ОФС «Растворимость».

**Механические включения.** Восстановленный препарат должен соответствовать требованиям ОФС «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».

**рН.** От 6,4 до 7,2. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании.

**Белок.** От 25 до 180 мг/мл. Определение проводят колориметрическим методом с биуретовым реактивом в соответствии с ОФС Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных». Метод А.

**Электрофоретическая однородность.** Фракция иммуноглобулинов должна составлять не менее 90 % от общего белка. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы» с использованием соответствующего стандартного образца.

**Молекулярные параметры**. Содержание мономеров и димеров должно быть не менее 85 %, полимеров и агрегатов – не более 10 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ».

**Фракционный состав.** Должна выявляться интенсивная линия преципитации IgG и не более четырех дополнительных линий. Определение проводят методом иммуноэлектрофореза в геле с использованием сыворотки против сывороточных белков крови человека в соответствии с ОФС «Иммуноэлектрофорез в агаровом геле».

**Термостабильность.** Препарат должен оставаться жидким и не образовывать геля после выдерживания в водяной бане или водяном термостате при температуре (56±1)°С в течение 4 ч.

**Стерильность.** Должен быть стерильным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

**Пирогенность или Бактериальные эндотоксины.** Должен быть апирогенным или содержать бактериальные эндотоксины в количестве не более 5 ЕЭ/мл.

Испытание проводят в соответствии с ОФС «Пирогенность» (тест-доза должна составлять 1,0 мл препарата на кг массы кролика) или в соответствии с ОФС «Бактериальные эндотоксины».

**Аномальная токсичность.** Препарат должен быть нетоксичным. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Испытания проводят на 5 здоровых белых мышах массой тела 18-20 г и двух морских свинках массой тела 250-300 г. Тест-доза для белых мышей составляет 0,5 мл (внутрибрюшинно), для морских свинок – 5,0 мл (подкожно в оба бока по 2,5 мл). Период наблюдения за животными составляет 7 сут.

**Специфическая (антирезусная) активность.** Определяют количественное содержание антирезус Rho(D) антител. Испытания проводят валидированными методами: проточной цитофлюориметрии, иммуноферментным анализом или модифицированным методом прямой гемагглютинации с использованием соответствующих стандартных образцов, аттестованных в Международных единицах. Активность испытуемого препарата рассчитывается путем сравнения со стандартным образцом (СО).

*Метод А. Метод проточной цитофлюориметрии.*

 Метод основан на специфическом связывании между антирезус Rho(D) иммуноглобулином и Rh (+) эритроцитами, которое выявляется по уровню свечения, вызванного мечеными флюорохромом вторичными антителами.

В соответствующие лунки F-образного 96-луночного планшета вносят по 50 мкл суспензии стандартных эритроцитов человека Rh (-), фенотип 0rr (например, в лунки H1-4) и суспензии стандартных эритроцитов человека Rh (+), фенотип 0R1R1 (например, в лунки А1-А5, В1-В5, С1-С5, D1-D5, E1-Е5, F1-F5, G1-G3). Добавляют по 50 мкл соответствующего разведения стандартного и испытуемого образцов таким образом, чтобы каждое разведение СО было внесено в лунки, содержащие суспензии стандартных эритроцитов человека Rh (+), фенотип 0R1R1, в трех повторностях (например, в лунки А1-А3, В1-В3, С1-С3, D1-D3, E1-Е3, F1-F3), а каждое разведение испытуемого образца – в четырех повторностях (например, в лунки А4-А5, В4-В5, С4-С5, D4-D5, E4-Е5, F4-F5). В три лунки (например, G1-G3) вносят 50 мкл фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л БСА. Планшет осторожно встряхивают (на шейкере) в течение 15 сек, затем инкубируют при температуре (37±2)°С в течение (40±4) мин. По окончании инкубации центрифугируют в течение 3 мин при 550 об/мин. Надосадочную жидкость удаляют, вносят по 200 мкл полученного по примеру 8 фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л БСА. Пробы осторожно встряхивают (на шейкере) в течение 15 сек и центрифугируют в течение 3 мин при 550 об/мин, надосадочную жидкость удаляют. Процедуру отмывания эритроцитов повторяют еще дважды.

Во все заполненные лунки микропланшета добавляют по 50 мкл раствора вторичных антител, меченых флюорохромом, и инкубируют при комнатной температуре (20±5) °С в защищенном от света месте в течение (20±2) мин.

По окончании инкубации во все заполненные лунки планшета добавляют по 150 мкл фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л БСА, центрифугируют в течение 3 мин при 550 об/мин, надосадочную жидкость удаляют. Во все заполненные лунки планшета добавляют по 200 мкл фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л БСА. Пробы осторожно встряхивают (на шейкере) в течение 15 сек и центрифугируют в течение 3 мин при 550 об/мин, надосадочную жидкость удаляют. Процедуру отмывания эритроцитов повторяют еще дважды.

Во все заполненные лунки планшета добавляют по 50 мкл фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л БСА. Пробы осторожно встряхивают (на шейкере) в течение 15 сек и помещают в проточный цитометр. Измеряют флюоресценцию клеток при условии отбора 12 мкл суспензии клеток из каждой лунки и сравнивают значения флюоресценции 10000 клеток с использованием аргонного лазера (от 492 нм до 520 нм).

На основании результатов измерения флюоресценции разведений стандартного образца для расчета в МЕ/мл строят график зависимости десятичного логарифма разницы флюоресценции стандартного образца и среднего значения флюоресценции трех измерений холостой пробы (ось ординат, F, FU) от десятичного логарифма концентрации антирезус Rho(D) антител (ось абсцисс, С, МЕ/мл). Содержание антирезус Rho(D) антител в испытуемом образце вычисляют, используя методы построения калибровочной кривой (линейная зависимость), параллельных шкал, углового коэффициента или иного подходящего статистического метода.

Критерии приемлемости:

-измеряемые значения флюоресценции исследуемых образцов должны быть внутри диапазона значений разведений стандартного образца;

-коэффициент корреляции должен быть не менее 0,97.

Примечания

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.

Приготовление фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л бычьего сывороточного альбумина (БСА). К 1000 мл фосфатного буферного раствора добавляют 1,0 г БСА, тщательно перемешивают, избегая образования пены. Раствор фильтруют через бумажный фильтр.

Подготовка суспензии стандартных эритроцитов. Эритроциты человека Rh (+), фенотип 0R1R1 (полученные не менее чем от 3-х доноров, не более 3 сут хранения) центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин при комнатной температуре (отдельно полученные от каждого донора), надосадочную жидкость сливают. Полученный осадок ресуспендируют в десятикратном объеме фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л БСА и снова центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об/мин при комнатной температуре. Процедуру повторяют не менее 3 раз до получения прозрачной надосадочной жидкости. Осадок эритроцитов от каждого из 3-х доноров смешивают в одной пробирке.

Для приготовления суспензии эритроцитов с концентрацией от 1ˑ104 до 5ˑ104 клеток/мкл 1 объем осадка эритроцитов ресуспендируют в 29 - 30 объемах фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л БСА.

Эритроциты человека Rh (-), фенотип 0rr (полученные не менее чем от 3-х доноров, не более 3 сут хранения) центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин при комнатной температуре (отдельно полученные от каждого донора), надосадочную жидкость сливают. Полученный осадок ресуспендируют в десятикратном объеме фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л БСА и снова центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об/мин при комнатной температуре. Процедуру повторяют не менее 3 раз до получения прозрачной надосадочной жидкости. Осадок эритроцитов от каждого из 3-х доноров смешивают в одной пробирке.

Для приготовления суспензии эритроцитов с концентрацией от 1ˑ104 до 5ˑ104 клеток/мкл 1 объем осадка эритроцитов ресуспендируют в 29 - 30 объемах фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л БСА.

Подготовка раствора вторичных антител, меченых флюорохромом. В качестве вторичных антител используют реагенты, содержащие F(ab’)2 фрагменты антител к иммуноглобулину G человека, меченые флюорохромом, например, R-фикоэритрином или фрюоресцеином. Восстанавливают содержимое флакона в соответствии с инструкцией по применению. К 1 объему восстановленного раствора вторичных антител, меченых флуоресцеином, добавляют 199 объемов фосфатного буферного раствора, содержащего 1 г/л БСА.

Подготовка испытуемого образца. Готовят восстановленный раствор и разводят его фосфатным буферным раствором, содержащим 1 г/л БСА, до ожидаемого содержания антирезус Rho(D) антител в диапазоне от 1,0 до 0,08 МЕ/мл (например, 1,071 МЕ/мл). Далее готовят не менее 3 последовательных (1,5 – 2,0 кратных) разведений в фосфатном буферном растворе, содержащем 1 г/л БСА. При необходимости корректируют разведение испытуемого образца до получения результатов в линейном участке кривой «доза-отклик». Например, при использовании вторичных антител, меченых R-фикоэритрином до содержания 0,536; 0,268; 0,134 МЕ/мл; при использовании вторичных антител, меченых флюоресцеином - до содержания 0,134; 0,067; 0,034 МЕ/мл.

Подготовка стандартного образца. В качестве стандартного образца используют раствор иммуноглобулина человека с определенным содержанием антирезус Rho(D) антител в количестве не менее 3,0 МЕ/мл. При необходимости стандартный образец восстанавливают в соответствии с инструкцией по применению. В фосфатном буферном растворе, содержащем 1 г/л БСА, готовят не менее 5 последующих разведений стандартного образца в диапазоне от 1,5 до 0,02 МЕ/мл, соответствующем разведениям исследуемого образца. При необходимости корректируют разведение СО до получения результатов в линейном участке кривой «доза-отклик». Например, при использовании вторичных антител, меченых R-фикоэритрином, стандартный образец разводят до содержания 1,425; 0,713; 0,356; 0,178 и 0,089 МЕ/мл; а при использовании вторичных антител, меченых флюоресцеином, - до содержания 0,356; 0,178; 0,089; 0,045 и 0,022 МЕ/мл.

*Метод В. Конкурентный иммуноферментный анализ*

Метод основан на конкурентном связывании между антирезус Rho(D) иммуноглобулином и биотинилированными моноклональными анти-D антителами к специфическому эпитопу D – антигена.

В лунки подготовленного планшета с фиксированными эритроцитами вносят по 250 мкл фосфатного буферного раствора, содержащего 20 г/л БСА, инкубируют при комнатной температуре (20±5) °С в течение 30 мин, затем удаляют жидкость из лунок, быстро переворачивая планшет. В соответствующие лунки планшета с фиксированными эритроцитами вносят по 50 мкл подготовленных разведений стандартного и испытуемого образцов в четырех независимых повторностях. Для отрицательного контроля в соответствующие лунки (не менее четырех) вносят по 50 мкл фосфатного буферного раствора, содержащего 10 г/л БСА. Герметизируют планшет с помощью пластиковой пленки и инкубируют при комнатной температуре (20±5) °С в течение 60 мин. По окончании инкубации удаляют жидкость из лунок, быстро переворачивая планшет. В лунки планшета вносят по 250-300 мкл солевого трис-буферного раствора, промывают с помощью автоматического устройства для промывки планшетов. Процедуру отмывания повторяют три раза. Полностью удаляют солевой трис-буферный раствор легким постукиванием перевернутого планшета по поверхности, покрытой фильтровальной бумагой.

В лунки планшета вносят по 50 мкл раствора конъюгированного щелочной фосфатазой авидин/стрептовидина и и инкубируют при комнатной температуре (20±5) °С в течение 30 мин. По окончании инкубации удаляют жидкость из лунок, быстро переворачивая планшет. В лунки планшета вносят по 250-300 мкл солевого трис-буферного раствора, промывают с помощью автоматического устройства для промывки планшетов. Процедуру отмывания повторяют три раза. Полностью удаляют солевой трис-буферный раствор легким постукиванием перевернутого планшета по поверхности, покрытой фильтровальной бумагой.

В лунки планшета вносят по 100 мкл раствора субстрата паранитрофенол фосфата и инкубируют при комнатной температуре (20±5) °С в защищенном от света месте в течение 10 мин. По окончании инкубации в лунки планшета вносят по 50 мкл 3 М раствора натрия гидроксида и регистрируют оптическую плотность при длине волны 405 нм.

Вносят поправки в значение оптической плотности, вычитая из значения оптической плотности для каждого образца результат, полученный для отрицательного контроля. Вычисляют среднее значение оптической плотности для каждого образца. Полученные значения оптической плотности прямо пропорциональны содержанию антирезус Rho(D) антител в соответствующих разведениях стандартного и испытуемого образцов. Содержание антирезус Rho(D) антител в испытуемом образце вычисляют, используя метод параллельных шкал или иного подходящего статистического метода.

Критерии приемлемости.

- относительное стандартное отклонение значений оптической плотности в пределах каждого разведения стандартного образца должно быть не более 20%;

- верхний и нижний 95 % доверительные интервалы должны составлять не более 20 %;

-коэффициент корреляции должен быть не менее 0,98.

Примечания

Приготовление фосфатного буферного раствора (см. примечание метода А).

Приготовление фосфатного буферного раствора, содержащего 10 г/л бычьего сывороточного альбумина (см. примечание метода А).

Приготовление 0,067М раствора фосфатно-солевого буфера (рН 5,4).

Для приготовления 23,99 г/л раствора натрия гидрофосфата в мерную колбу вместимостью 500 мл вносят 11,99 г натрия гидрофосфата, добавляют 400 мл воды очищенной, размешивают, доводят объем раствора до метки водой очищенной, и вновь перемешивают.

Для приготовления 29,12 г/л раствора натрия дигидрофосфата моногидрата мерную колбу вместимостью 500 мл вносят 12,66 г натрия дигидрофосфата моногидрата, добавляют 400 мл воды очищенной, размешивают, доводят объем раствора до метки водой очищенной, и вновь перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 250 мл вносят 200 мл 23,99 г/л раствора натирия гидрофосфата и 3,5 мл 29,12 г/л раствора натрия дигидрофосфата моногидрата, перемешивают, доводят рН раствора до 5,4±0,1 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты. Хранят при температуре 5±3 ºС не более 1 мес.

Приготовление раствора L – цистеина. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 4,84 г L – цистеина и добавляют 900 мл воды очищенной. После растворения доводят объем раствора до метки водой очищенной, и вновь перемешивают. Хранят при температуре 5±3 ºС не более 1 мес.

Приготовление раствора натрия ЭДТА. В мерную колбу вместимостью 500 мл вносят 1,86 г натрия ЭДТА, добавляют 400 мл воды очищенной. После растворения доводят объем раствора до метки водой очищенной и вновь перемешивают. Хранят при температуре 5±3 ºС не более 1 мес.

Подготовка раствора папаина. Во флакон, содержащий 25 мг лиофилизированного папаина (с активностью не менее 10 ед/мг белка), вносят 2,5 мл 0,067 М раствора фосфатно-солевого буфера (рН 5,4), инкубируют при температуре (37±1) 0С в течение 15 мин. По окончании инкубации раствор перемешивают с помощью автоматической пипетки, затем инкубируют еще 15 мин при температуре (37±1) 0С. Для активации папаина к 1 объему инкубированного раствора папаина добавляют 1 объем раствора L- цистеина и 1 объем раствора натрия ЭДТА, перемешивают. Полученный раствор доводят до 10 объемов 0,067 М раствора фосфатно-солевого буфера (рН 5,4). Раствор используют свежеприготовленным. Возможно хранение раствора при температуре минус (21±1) °С в течение 12 мес. Раствор после оттаивания повторному замораживанию не подлежит.

Буферный раствор для фиксации клеток. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 18,02 г глюкозы; 4,09 г натрия хлорида; 1,24 г кислоты борной; 10,29 г натрия цитрата и 0,74 г натрия ЭДТА и добавляют 900 мл воды очищенной. Доводят рН раствора до 7,2-7,3 0,1М раствором натрия гидроксида, перемешивают и доводят объем раствора до метки водой очищенной, и вновь перемешивают. Хранят при температуре 5±3 ºС не более 1 мес.

Подготовка суспензии эритроцитов человека. Эритроциты человека Rh (+), фенотип 0R2R2 (полученные не менее чем от 3-х доноров, не более 3 сут хранения) центрифугируют 5 мин при 1500–2000 об/мин при комнатной температуре надосадочную жидкость сливают. Полученный осадок ресуспендируют в десятикратном объеме фосфатного буферного раствора и снова центрифугируют в течение 5 мин при 1500–2000 об/мин при комнатной температуре. Процедуру повторяют не менее 3 раз до получения прозрачной надосадочной жидкости.

В стеклянную пробирку вносят 2 объема промытых эритроцитов и 1 объем раствора папаина, инкубируют в течение 10 мин при температуре (37±0,5) °С, а затем центрифугируют при 1500–2000 об/мин в течение 5 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. Процедуру повторяют 3 раза.

Для приготовления 0,1 % суспензии 1 объем осадка эритроцитов, обработанных папаином, ресуспендируют в 999 объемах охлажденного буферного раствора для фиксации клеток.

Подготовка планшет с фиксированными эритроцитами. В лунки F-образного 96-луночного планшета (покрытого смесью гидрофобных и гидрофильных областей для оптимальной адсорбции иммуноглобулинов Ig G) вносят по 50 мкл суспензии эритроцитов человека Rh (+), фенотип 0R2R2, центрифугируют в течение 3 мин при 800 об/мин при температуре (5±3) °С. Не удаляя надосадочную жидкость в каждую лунку вносят по 100 мкл раствора глютаральдегида, инкубируют при комнатной температуре (20±5) °С в течение 10 мин и удаляют жидкость из лунок, быстро переворачивая планшет. В заполненные лунки планшета добавляют по 250-300 мкл фосфатно-солевого буферного раствора, промывают с помощью автоматического устройства для промывки планшетов. Процедуру отмывания повторяют три раза. Полностью удаляют фосфатно-солевой буферный раствор легким постукиванием перевернутого планшета по поверхности, покрытой фильтровальной бумагой.

Для хранения во все лунки планшета вносят по 100 мкл буферного раствора для фиксации клеток, герметично закрывают пластиковой пленкой. Допустимо хранение планшет с фиксированными эритроцитами при температуре (5±3) °С. Перед использованием удаляют буферный раствор для фиксации клеток легким постукиванием перевернутого планшета по поверхности, покрытой фильтровальной бумагой.

Приготовление раствора биотинилированных моноклональных анти-D – антител BRAD–5. Содержимое флакона восстанавливают в воде очищенной в соответствии с инструкцией по применению. Для получения раствора с концентрацией 0,25 мг/мл к 1 объему восстановленных биотинилированных моноклональных анти-D – антител BRAD–5 добавляют 39 объемов фосфатного буферного раствора, содержащего 10 г/л БСА.

Подготовка испытуемого образца

Готовят восстановленный раствор препарата (методику восстановления указывают в нормативной документации производителя) и разводят его фосфатным буферным раствором, содержащим 10 г/л бычьего сывороточного альбумина, до ожидаемого содержания антирезус Rho(D) антител 30 МЕ/мл. Далее готовят не менее 4 последовательных двукратных разведений в фосфатном буферном растворе, содержащем 10 г/л БСА (например, до содержания 15,00 МЕ/мл; 7,50 МЕ/мл; 3,75 МЕ/мл; 1,88 МЕ/мл). При необходимости корректируют разведение испытуемого образца до получения результатов в линейном участке кривой «доза-отклик». Разведения готовят в четырех независимых повторностях.

В лунки U или V -образного 96-луночного планшета вносят по 35 мкл подготовленных разведений испытуемого образца, начиная с 30 МЕ/мл, и по по 35 мкл раствора биотинилированных моноклональных анти-D – антител BRAD–5.

Подготовка стандартного образца

В качестве СО используют раствор иммуноглобулина человека с определенным содержанием антирезус Rho(D) антител в количестве не менее 30,0 МЕ/мл. При необходимости СО восстанавливают в соответствии с инструкцией по применению. В фосфатном буферном растворе, содержащем 10 г/л БСА, готовят не менее 5 двукратных разведений стандартного образца начиная с 30 МЕ/мл, соответствующих разведениям исследуемого образца. (например, 30,00 МЕ/мл; 15,00 МЕ/мл; 7,50 МЕ/мл; 3,75 МЕ/мл; 1,88 МЕ/мл). При необходимости корректируют разведение стандартного образца до получения результатов в линейном участке кривой «доза-отклик». Разведения готовят в четырех независимых повторностях.

В лунки U или V-образного 96-луночного планшета вносят по 35 мкл подготовленных разведений испытуемого образца, начиная с 30 МЕ/мл, и по по 35 мкл раствора биотинилированных моноклональных анти-D – антител BRAD–5.

Примечания

Приготовление раствора глютаральдегида. Смешивают 90 мкл раствора глютаральдегида (250 мг/мл) и 24 мл охлажденного фосфатного буферного раствора. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление раствора конъюгированного щелочной фосфатазой авидин/стрептовидина. К 1 объему конъюгированного щелочной фосфатазой авидин/стрептовидина добавляют 199 объемов солевого трис-буферного раствора, содержащего 10 г/л БСА.

Приготовление раствора субстрата паранитрофенола фосфата производится в соответствии с инструкцией по применению.

Приготовление 3М раствора натрия гидроксида. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 12,0 г натрия гидроксида, добавляют 80 мл воды очищенной. После растворения доводят объем раствора водой очищенной до метки. Хранят при температуре (20±5) °С, не более 6 мес.

*Метод С. Метод гемагглютинации*

Метод основан на способности антирезус Rho(D) антител вызывать визуально выявляемую агглютинацию Rh (+)эритроцитов человека.

Содержание антирезус Rho(D) антител определяют с использованием папаинизированных Rh (+) эритроцитов человека группы крови I (0). Предпочтительно использование эритроцитов фенотипа 0R2R2, возможно также применение эритроцитов фенотипов 0R1R1 или 0R1R2. Смешивание эритроцитов разных фенотипов недопустимо.

Для контроля специфичности анализа применяют D-отрицательные эритроциты фенотипа 0rr.

В стеклянные пробирки или лунки планшета вносят равное количество соответствующего разведения препарата и 3% суспензии Rh (+) эритроцитов человека группы крови I (0) − первый ряд и 3% суспензии Rh (-) эритроцитов человека группы крови I (0) − второй ряд. К подготовленным разведениям стандартного образца также добавляют равное количество 3% суспензии Rh (+) эритроцитов человека группы крови I (0) − первый ряд и 3% суспензии Rh (-) эритроцитов человека группы крови I (0) − второй ряд. Пробы осторожно встряхивают в течение 10 сек, затем центрифугируют в течение 1 мин при 80 об/мин. Пробирки (планшеты) располагают под углом 70° к горизонтальной поверхности и оценивают визуально агглютинацию эритроцитов через 4 – 5 мин (но не более чем через 10 мин).

Содержание антирезус Rho(D) антител, определяемое максимальным разведением препарата, при котором наблюдают агглютинацию любой интенсивности, сравнивают с содержанием антирезус Rho(D) антител в стандартном образце иммуноглобулина человека антирезус Rho(D). При отсутствии корреляции в результатах агглютинации разведений испытуемого образца с результатом агглютинации разведений стандартного образца испытания повторяют, используя иные разведения образцов.

Критерии приемлемости результатов:

− в пробирках (планшетах), содержащих суспензию D-отрицательных эритроцитов человека, агглютинация должна отсутствовать. Наличие агглютинации в этих пробирках (планшетах, микропробирках) свидетельствует о неспецифической реакции; испытания в этом случае необходимо повторить.

Примечания

Приготовление фосфатного буферного раствора. (приготовление по методу А)

Приготовление фосфатного буферного раствора, содержащего 2 г/л бычьего сывороточного альбумина. К 1000 мл фосфатного буферного раствора добавляют 2,0 г БСА, тщательно перемешивают, избегая образования пены. Раствор фильтруют через бумажный фильтр.

Подготовка испытуемого образца.

Готовят восстановленный раствор препарата (методику восстановления указывают в нормативной документации производителя) и разводят его фосфатным буферным раствором, содержащим 2 г/л бычьего сывороточного альбумина, до ожидаемого содержания антирезус Rho(D) антител 0,5 МЕ/мл. Далее готовят ряд последовательных не более чем 1,5 кратных разведений в фосфатном буферном растворе, содержащем 2 г/л БСА (например, до ожидаемого содержания 0,018 МЕ/мл; 0,012 МЕ/мл; 0,008 МЕ/мл; 0,005 МЕ/мл; 0,003 МЕ/мл; 0,002 МЕ/мл). При необходимости корректируют разведения испытуемого образца до получения результата агглютинации, коррелирующего с результатом агглютинации разведений стандартного образца.

Подготовка стандартного образца.

В качестве стандартного образца используют раствор иммуноглобулина человека с определенным содержанием антирезус Rho(D) антител, например, в количестве 285 МЕ/мл. При необходимости стандартный образец восстанавливают в соответствии с инструкцией по применению. Готовят ряд последовательных не более чем 1,5 кратных разведений в фосфатном буферном растворе, содержащем 2 г/л бычьего сывороточного альбумина, соответствующих разведениям исследуемого образца (например, до содержания 0,018 МЕ/мл; 0,012 МЕ/мл; 0,008 МЕ/мл; 0,005 МЕ/мл; 0,003 МЕ/мл; 0,002 МЕ/мл).

Подготовка раствора папаина

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

 Подготовка суспензии стандартных эритроцитов

Эритроциты человека Rh (+)группы крови I (0) (полученные не менее чем от 3-х доноров, не более 3 сут хранения) центрифугируют в течение 10 мин при 1500–2000 об/мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость сливают, осадок ресуспендируют в десятикратном объеме фосфатного буферного раствора и центрифугируют 10 мин при тех же условиях. Процедуру повторяют не менее 3 раз, до получения прозрачной надосадочной жидкости.

В стеклянную пробирку вносят равные объемы промытых эритроцитов и раствора папаина, инкубируют в течение 15 мин при температуре (37,0±0,5) 0С, а затем центрифугируют при 1500–2000 об/мин в течение 10 мин. 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 папаинизированных эритроцитов ресуспендируют в 32 объемах фосфатного буферного раствора, содержащего 2 г/л БСА.

Аналогичным образом приготавливают 3 % суспензию Rh (-) эритроцитов человека группы крови I (0) (полученные не менее чем от 3-х доноров, не более 3 сут хранения).

**Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg).** Препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих чувствительность не ниже 0,1 МЕ/мл, в соответствии с инструкциями по применению.

**Антитела к вирусу гепатита С.** Антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100 % чувствительность и специфичность, в соответствии с инструкциями по применению.

**Антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1.** Препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1. Определение проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения Российской Федерации и имеющих 100 % чувствительность и специфичность, в соответствии с инструкциями по применению.

**Упаковка и маркировка.** В соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

На вторичную (потребительскую) упаковку лекарственных средств, должна наноситься надпись: «Антитела к ВИЧ-1, ВИЧ-2, к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В отсутствуют».

**Хранение.** При температуре от 2 до 8° С в соответствии с ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека». Хранят в сухом защищенном от света месте. Замораживание не допускается.