

У серію лунок розподіляють по 20 мкл нормальної плазми людини та по 20 мкл *антитромбіну III розчину P1*. Додають у серію лунок 20, 60, 100 та 140 мкл випробовуваного або стандартного розчину та доводять об'єми в кожній лунці до 200 мкл, використовуючи буфер для розведень (вміст гепарину в кінцевій \blacktriangledown реакційній \blacktriangle суміші — 0.02-0.08 МО/мл).

Метод кінцевої точки. По 40 мкл вмісту кожної з лунок переносять у другий ряд лунок, додають по 20 мкл *фактора Ха бичачого розчину P* та інкубують за температури 37 °С протягом 30 с. Додають по 40 мкл 1 ммоль/л розчину хромогенного субстрату фактора Ха та інкубують за температури 37 °С протягом 3 хв. Реакцію переривають зниженням значення рН додаючи придатний реактив, наприклад 20 % (об/об) *оцтової кислоти льодяної розчину P*, та вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 405 нм (2.2.25). Зазвичай придатною є тривалість реакції від 3 до 15 хв, але допускаються відхилення від цього інтервалу за умови отримання кращої лінійної залежності «доза-відповідь».

Кінетичний метод. По 40 мкл вмісту кожної з лунок переносять у другий ряд лунок, додають по 20 мкл *фактора Ха бичачого розчину P* та інкубують за температури 37 °С протягом 30 с. Додають по 40 мкл 2 ммоль/л розчину хромогенного субстрату фактора Ха, інкубують за температури 37 °С та вимірюють швидкість розщеплення субстрату постійним вимірюванням оптичної густини за довжини хвилі 405 нм (2.2.25), визначаючи таким чином початкову швидкість розщеплення субстрату. Це значення має знаходитися в лінійній залежності від залишкової концентрації фактора Ха. Перевіряють \blacktriangledown придатність \blacktriangle визначення та обчислюють активність гепарину у випробовуваному препараті з використанням звичайних методів статистичного аналізу для визначення кутового коефіцієнта (наприклад, 5.3).

2.7.13. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИ-D-ІМУНОГЛОБУЛІНУ ЛЮДИНИ

МЕТОДА

Активність анти-D-імуноглобуліну людини оцінюють порівнянням кількості потрібної для аглютинації D-позитивних еритроцитів, з кількістю стандартного препарату, каліброваного в Міжнародних одиницях (МО), яка потрібна для досягнення такого ж ефекту.

МО — активність, що міститься у зазначеній кількості міжнародного стандартного препарату. Еквівалент МО міжнародного стандартного препарату встановлює Всесвітня організація охорони здоров'я.

БСП анти-D-імуноглобуліну людини калібрований у МО відносно міжнародного стандарту та призна-

чений для використання в кількісному визначенні анти-D-імуноглобуліну людини.

Використовують пул D-позитивних еритроцитів, зібраних не раніше ніж за 7 діб до випробування, що зберігалися відповідним чином та отриманих не менше ніж від чотирьох груп донорів із групою крові 0R₁R₁N. До придатного об'єму клітин, попередньо тричі відмитих розчином 9 г/л *натрію хлориду P*, додають рівний об'єм *розчину бромеліну P*, дають відстоятися за температури 37 °С протягом 10 хв, центрифугують, відокремлюють надосадову рідину (супернатант) та відмивають тричі розчином 9 г/л *натрію хлориду P*. Суспендують 20 об'ємів еритроцитів у суміші 15 об'ємів інертної сироватки, 20 об'ємів розчину 300 г/л *альбуміну бика P* та 45 об'ємів розчину 9 г/л *натрію хлориду P*. Отриману суспензію поміщають у крижану воду та охолоджують за безперервного перемішування.

За допомогою каліброваного автоматичного диллятора готують придатні розведення випробовуваного та стандартного препаратів із використанням як розріджувача розчину, що містить 5 г/л *альбуміну бика P* та 9 г/л *натрію хлориду P*.

Використовують придатний прилад для безперервного автоматичного аналізу. \blacktriangledown Зазвичай придатним є наступний протокол: \blacktriangle температуру в трубопроводі, крім інкубаційного змійовика, підтримують на рівні 15.0 °С. Уводять за допомогою насоса в трубопровід апарату суспензію еритроцитів зі швидкістю 0.1 мл/хв та розчин 3 г/л *метилцелюлози 450 P* зі швидкістю 0.05 мл/хв. Уводять розведення випробовуваного та стандартного препаратів зі швидкістю 0.1 мл/хв протягом 2 хв. Перед уведенням чергового розведення вводять розчин для розведень зі швидкістю 0.1 мл/хв протягом 4 хв.

Вводять повітря зі швидкістю 0.6 мл/хв. Інкубують за температура 37 °С протягом 18 хв, після чого диспергують стовпчики еритроцитів введенням зі швидкістю 1.6 мл/хв розчину 9 г/л *натрію хлориду P*, що містить для запобігання руйнуванню зразка бульбашками повітря придатний зволожуючий агент (наприклад, *полісорбат 20 P* у кінцевій концентрації 0.2 г/л). Дають аглютинатам відстоятися та двічі проводять переливання: спочатку зі швидкістю 0.4 мл/хв, потім — зі швидкістю 0.6 мл/хв. Неаглютиновані еритроцити лізують розчином, що містить 5 г/л *октоксинулу 10 P*, 0.2 г/л *калію фероціаніду P*, 1 г/л *натрію бікарбонату P* та 0.05 г/л *калію ціаніду P* та подається зі швидкістю 2.5 мл/хв. Щоб забезпечити перетворення гемоглобіну, система включає 10-хвилинну затримку змійовика. Оптичну густину (2.2.25) в гемолізаті реєструють безперервно за довжини хвилі, обраної в інтервалі від 540 до 550 нм. Визначають діапазон концентрацій антитіл, протягом якого існує лінійна залежність між концентрацією та отриманою зміною оптичної густини (ΔA). За результатами отримують стандартну криву, використовуючи лінійні ділянки кривої для визначення активності випробовуваного препарату.