

г/л бычьего сывороточного альбумина (1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256). При использовании гелевого метода (Метод В) разведения испытуемого образца готовят с использованием 0,9% раствора натрия хлорида или буферного раствора низкой ионной силы (LISS).

2. Подготовка стандартных образцов содержания анти-D антител. В качестве стандартных образцов используют 5% раствор иммуноглобулина человека, содержащий 0,0475 МЕ/мл анти-D антител и имеющий номинальный титр в реакции гемагглютинации 1:8 (положительный стандартный образец) и 5% раствор иммуноглобулина человека, содержащий анти-D антитела в разведении не более 1:2 (отрицательный стандартный образец). Содержание анти-D антител в положительном стандартном образце является максимально допустимым для препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения. Подготовка стандартных образцов проводят в соответствии с инструкцией по применению. Анализ проводят с образцами, разведенными фосфатным буферным раствором (рН 7,4±0,1), содержащим 2 г/л бычьего сывороточного альбумина, до содержания белка 25 г/л.

3. 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 (6±2)⁰С в течение 5 сут или при температуре минус (21±1)⁰С в течение 6 мес. Раствор после оттаивания повторному замораживанию не подлежит.

4. Подготовка суспензии стандартных эритроцитов. Свежеприготовленные D-положительные эритроциты (хранившиеся не более 3 сут), полученные не менее чем от 3 доноров, 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±0,5)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 бычьего сывороточного альбумина.

Аналогичным образом приготавливают 3% суспензию D-отрицательных эритроцитов, полученных от 1–3 доноров.