

Винахід відноситься до галузі медицини, а саме імунохімії, стосується лабораторної діагностики.

Правець залишається однією із важливих проблем сучасної інфекційної патології України в зв'язку з високою (до 60%) летальністю та стабілізацією захворюваності нарівні 0,08 на 100000 населення.

Недосконалість сучасної системи лабораторного контролю за станом колективного протиправцевого імунітету зумовлює необхідність пошуку прискорених ефективних методів визначення захисного титру правцевого антитоксину в крові людини та розробки нових високочутливих діагностичних препаратів.

В основі більшості методів оцінки імунітету до правцю лежить визначення в сироватках крові протиправцевого антитоксину. Найчастіше використовується реакція пасивної гемаглютинації еритроцитів (РПГА). Даний метод має ряд недоліків, до яких, в першу чергу, слід віднести розбіжність результатів при дослідженні окремих сироваток у порівнянні з класичними біологічними тестами (РН токсину на білих мишах), причому РПГА завищує титри антитоксину приблизно вдвічі.

Останнім часом в лабораторній діагностиці ряду бактеріальних інфекцій використовуються тест-системи, в яких природні носії (еритроцити) замінені синтетичними латексами [1, 2].

Відсутність латексних діагностиків в Україні зумовило необхідність нових, більш чутливих та специфічних діагностичних препаратів, де носіями антигену є вітчизняні латексні полістирольні мікросфери.

Таким чином, в основі винаходу є створення високочутливого та специфічного антигенного діагностикуму на основі полістирольних латексів шляхом фіксації на них специфічних антигенних детермінант з використанням для експрес-індикації правцевого антитоксину реакції аглютинації латексу.

Латекси - полімерна суспензія, яка отримана шляхом беземульгаторної радикальної сополімеризації гідропероксидного мономеру 5-гідроперокси-5-метил-1-гексил-3-іну (ВЕГ) і акрилової кислоти (АК) в водній фазі. В якості ініціатора радикального процесу виступає ВЕГ. Латексні мікросфери мають діаметри в інтервалі від 0,8 до 1,2мкм, з коефіцієнтом полідисперсності, близьким до одиниці ($K_p < 1,1$). На поверхні цих частинок знаходяться реакційно-спроможні групи для ковалентного зв'язування з білком.

В якості імуноспецифічного реагенту для отримання кон'югатів з полімерними мікросферами використовували специфічний антиген - очищений правцевий анатоксин виробництва НВО "Биомед" (Росія).

Сенсибілізацію латексу антигеном здійснювали наступним чином:

до 3% суспензії латексу, приготовленої на основному робочому гліциновому буфері рН 8,2, (0,75% р-н гліцину в 1% р-ні NaCl) у співвідношенні 1:1 додають розчин антигену (попередньо віддіалізований проти цього ж буферу), розчин "антигену готують на тому ж буфері з розрахунку того, що в готовому препараті концентрація антигену повинна становити 500мкг/мл. Антиген у цій концентрації повністю фіксується на частинках латексу. Діагностикум з такою сенсибілізуючою дозою антигену працює в реакції аглютинації латексу з максимальним титром, який відповідає 0,006 - 0,003МО/мл;

суміш залишають на 2 год. при помішуванні на магнітній мішалці при 37°C на водяній бані;

після цього суміш залишають на 24-48 год. при 4-8°C. Після сенсибілізації латекс очищають від залишків антигену:

центрифугують при 8тис.об/хв., 4-8°C протягом 10хв.;

осад ресуспендують в двократному об'ємі робочого буферу з додаванням NaN_3 і БСА (0,9г/л і 1г/л відповідно), і залишають на 30хв., після чого двічі центрифугують в тому ж режимі, промиваючи робочим буфером;

кінцево ресуспендують до початкового об'єму робочою буферною сумішшю.

Реакцію аглютинації латексу здійснювали крапельним методом на склі, результати відчитували візуально на темному фоні. Інтенсивність реакції оцінювали за системою 4-ох плюсів (візуально спостерігались різної інтенсивності однакові по величині та густині згустки). Позитивно вважали реакцію, оцінену в 2 плюси та більше, яка утримувалася протягом 3-х хвилин. Всього на постановку та облік реакції витрачалось 20-30хв.

Дослідження специфічності отриманих латексних діагностиків перевіряли в реакції аглютинації латексу (РАЛ) з гіперімунними сироватками до шігел Зонне, Флекснера (1-5), до рецепторів сальмонел (2, 4, 9) а також до ієрсинії псевдотуберкульозу, кишкового ієрсиніозу сероварів 09 і 03 в розведеннях від 1:4 до 1:32.

В жодному розведенні не відзначено перехресних реакцій між створеним діагностикумом та перерахованими сироватками.

Для визначення діагностичної цінності розробленої тест-системи аналізували результати РАЛ в порівнянні з РПГА, 25 сироваток крові людей.

В РПГА використовували діагностичний комплекс "Мікроаналіз дифтерія, правець" (виробництво НВО "Биомед", Росія).

Для постановки ІФА використовували імуноферментні тест-системи для виявлення правцевого антитоксину (виробництво "Биомед", Росія, серія 7к).

Сироватки були об'єднані у три групи:

1) клінічно здорові люди, у яких взяли кров перед плановою імунізацією проти правцю;

2) сироватки хворих з діагнозом "правець", у яких кров взяли на 4-6-й день розвитку інфекційного процесу перед введенням їх протиправцевої стандартної сироватки;

3) імунізовані проти правцю правцевим анатоксином донори.

Результати різних методів індикації правцевого антитоксину представлені у таблиці (РПГА, ІФА, у порівнянні з РАЛ).

Як бачимо з таблиці, усі три методи мають різну чутливість щодо визначення титру правцевого антитоксину в сироватці крові.

За допомогою РПГА було виявлено 6 серонегативних сироваток (1, 5, 7, 9 у I групі та 2, 4 у II).

В РАЛ та ІФА кількість серонегативних сироваток зменшується до трьох (5 та 7 у I групі та 4 у II групі), що свідчить про вищу ніж у РПГА чутливість даних методів щодо виявлення правцевого антитоксину.

Відсутність серонегативних сироваток в III групі при застосуванні усіх трьох методів зумовлено тим, що люди, сироватки крові яких об'єднані в цю групу, пройшли імунізацію та наступну ревакцинацію правцевим анатоксином.

В результаті цього у них виробився настільки високий титр антитоксину, що його концентрація набагато перевищує межі найменшої чутливості РПГА, ІФА та РАЛ.

Виявлено також, що чим більший титр антитіл, тим менше число співпадіння результатів досліджень сироваток різними методами (з різницею 0,1 у групі I; 0,01 - у II; 1 - у III): при межах титру >0,5<2,0 МО/мл - 54,8%; при межах 8,0 - 16 МО/мл і вище - 19,3%.

Усі три методи характеризуються різною тривалістю постановки. В РПГА чітку картину аглютинації можна спостерігати через 2, 3, 5 годин, а на проведення ІФА витрачається 4-6 годин. Проте, в РАЛ аглютинація частинок латексу спостерігається вже через 3-5 хвилин після приготування реакційної суміші в лунках на склі, а на постановку всієї реакції іде не більше - 30 хвилин.

Таблиця 1

Порівняння ефективності РАЛ, РПГА, ІФА як методів індикації правцевого антитоксину

Група	№ сироватки	Титр, МО/мл		
		ІФА	РПГА	РАЛ
I	1	0,06	0,0	0,04
	2	0,06	0,16	0,25
	3	0,1	0,16	- 0,15
	4	1,16	0,8	1,0
	5	0,0	0,0	0,0
	6	0,16	0,5	1,5
	7	0,0	0,0	0,0
	8	0,5	1,0	0,8
	9	0,02	0,0	0,02
	10	0,16	0,1	0,16
	M±m	0,26±0,1	0,28±0,1	0,37±0,1
II	1	0,19	0,16	0,16
	2	0,07	0,0	0,06
	3	0,17	0,06	0,06
	4	0,0	0,0	0,0
	5	0,06	0,1	0,1
	6	0,07	0,06	0,06
	M±m	0,08±0,01	0,06±0,01	0,07±0,01
III	1	9,0	6,6	6,6
	2	11,6	16,0	16,0
	3	3,3	2,6	3,3
	4	30,3	26,6	20,0
	5	12,6	13,6	12,0
	6	28,3	32,0	40,0
	7	8,0	5,3	13,3
	8	2,6	3,3	4,0
	9	14,3	16,0	14,0
	M±m	12,2±1,0	13,5±1,0	14,3±1,0

Окрім цього, значні затрати праці при постановці ІФА та РПГА, високу вартість діагностичних наборів, недоцільно використовувати ці методи для визначення титру протиправцевого антитоксину в сироватках крові в поодиноких діагностичних випадках.

Усі три методи ґрунтуються на різних принципах наочної оцінки результатів. Найскладнішим у цьому відношенні є ІФА, оскільки для обліку результатів тут використовується спектрофотометр, пристосований для визначення оптичної густини реакційної суміші у лунках полістирольних планшет.

Однак, цей метод дає змогу визначити титр не лише за розведеннями стандартної сироватки (як в РАЛ і РПГА), а визначити його значення більш диференційовано, оскільки в ІФА концентрацію протитравцевих антитіл визначають за калібрувальною кривою, побудованою за даними реакції з стандартною сироваткою.

Але найбільшу наочну вираженість має РАЛ, що наближає його до способу експрес-визначення груп крові, який давно використовується в клінічних лабораторіях.

Таким чином, підтверджена висока чутливість та специфічність нової латексної тест-системи для експрес-визначення правцевого антитоксину в крові людини, у поєднанні з швидким візуальним обліком результатів, відсутністю використання спеціальної апаратури, дефіцитних матеріалів, значним економічним ефектом за рахунок здешевлення сировини (носія антигену).

Література:

1. Чайка Н.А. Реакция агглютинации латекса // Иммунологическая диагностика вирусных инфекций. - М.: Медицина, 1989. - С.121-141.

2. Блинковский А.М., Чечик О.С., Полинский О.С., Ярославов А.А. Полистирольные карбоксилированные латексы как носители иммуносорбентов // Журн. всеоюз. хим. общ. - 1989. - №1. - С.122-123.