

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

Прототипом винаходу є еритроцитарний діагностикум - тонізовані еритроцити з приєднаними до них антигенами. Цей діагностикум використовується для реакції пасивної гемаглютинації з метою визначення титру відповідних антитіл в сироватці крові людини. Але даний метод має ряд недоліків, до яких в першу чергу слід віднести розбіжність результатів при дослідженні окремих сироваток крові у порівнянні з класичними біологічними тестами через наявність в досліджуваній сироватці неспецифічних аглютининів проти власних поверхневих антигенів, які не дезактивуються обробкою, та високою вартістю природного носія антигенів. Крім того, ці дослідження вимагають певного рівня лабораторного обладнання [1, 2, 3].

В основі винаходу лежить розробка більш чутливої та специфічної діагностичної тест-системи для експрес-визначення титру дифтерійного антитоксину в крові людини на основі реакції аглютинації латексу (РАЛ).

Це завдання вирішується шляхом сенсibilізації вперше синтезованих в Україні монодисперсних полістирольних латексів очищеним дифтерійним анатоксином, виробництва "Иммунопрепарат".

Діагностична цінність створеної тест-системи, її чутливість та специфічність значно вищі від інших методів, що застосовуються для визначення дифтерійного антитоксину в крові людини.

Нова тест-система дозволить вдосконалити систему лабораторного контролю за напруженістю імунітету, його стійкістю, тривалістю, ефективністю масових вакцинацій населення, значно зменшить витрати на тест-системи, відмовившись від закупки діагностичних препаратів за кордоном.

Зазначена тест-система та спосіб її виготовлення в літературі не описані.

Латекси - полімерна суспензія, яка отримана шляхом беземальгаторної 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 1,2 мкм, 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 дифтерійний анатоксин виробництва НВО "Иммунопрепарат" (Росія).

Сенсibilізацію латексу антигеном здійснювали наступним чином:

до 3% суспензії латексу, приготовленої на 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 500 мкг/мл. Антиген у цій концентрації повністю фіксується на частинках латексу. Діагностикум з такою сенсibilізуючою дозою антигену працює в реакції аглютинації латексу з максимальним титром, який відповідає 0,003 - 0,0015 МО/мл;

компоненти змішують 2 год. на магнітній мішалці при 37°C;

після цього суміш залишають на 24-48 год. при 4-8°C.

Після сенсibilізації латекс очищають від залишків антигену:

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

осад ресуспендують в двократному об'ємі робочого буферу з додаванням NaN_3 і БСА (0,9 г/л і 1 г/л відповідно), і залишають на 30 хв., 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 20-30 хв.

Дослідження специфічності отриманих латексних діагностикумів перевіряли в реакції аглютинації латексу (РАЛ) з гіперімунними сироватками до шігел Зонне, Флекснера (1-5), до рецептерів сальмонел (2, 4, 0,6, 0,9) а також до ієрсиній 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.

Чутливість діангностикуму визначалась шляхом проведення РАЛ із дифтерійною стандартною сироваткою (ДСС). Активність даної сироватки в реакції пасивної гемаглютинації (РПГА) із ДСС становить 0,003-0,0015 МО/мл (6-7 розведення сироватки, що відповідає титру 1:3200-1:6400).

При проведенні РАЛ зі створеним діагностикумом ДСС розводили так само, як для РПГА (ряд двократних розведень, починаючи від 0,1 МО/мл (1:100)). Латексний діагностикум змішували з розведеною сироваткою у співвідношенні 1:4 на склі і залишали на 20 хв. на 37°C водяній бані.

Результати зчитували, враховуючи останнє розведення, в якому спостерігалась аглютинація при умові відсутності аглютинації в контролі.

Латексні препарати в реакції з ДСС показали таку ж активність, як РПГА діагностикум, тобто, картина аглютинації спостерігається у 6-7 розведенні (0,003-0,0015 МО/мл).

Для порівняння РАЛ із традиційним способом визначення титру дифтерійного антитоксину - РПГА, проведено кореляційний аналіз цих методів. Досліджені сироватки людей на предмет визначення у них вищезгаданого титру обома способами. Коефіцієнт кореляції між результатами, отриманими за допомогою РАЛ і РПГА, становить в середньому $0,8 \pm 0,03$. Це свідчить про значну діагностичну цінність розробленої латексної тест-системи.

Враховуючи також вітчизняне походження сировини для створення латексного діагностикуму, простоту постановки РАЛ та швидкість протікання реакції, нова тест-система може бути запропонована для широкого використання в практичній медицині.

Таким чином, підтверджена висока чутливість та специфічність нової латексної тест-системи для експрес-визначення дифтерійного антитоксину в крові людини, у поєднанні з швидким візуальним обліком результатів,

відсутністю необхідності використання спеціальної апаратури, дефіцитних матеріалів, значним економічним ефектом за рахунок здешевлення сировини (носія антигену).

Література:

1. Блинковский А.М., Чечик О.С., Полинский О.С., Ярославов А.А. Полистирольные карбоксилированные латексы как носители иммуносорбентов // Журн. всесоюз. хим. общ. - 1989. - №1. - С.122-123.
2. Парфенова Е.В., Прокопов Н.В., Черкасов Р.В. Приготовление латексных диагностикумов на основе поверхностных антигенов *Candida tropicalis* //ЖМЭИ. - 1994. - №6. - С.97-99.
3. Лисин В.В., Тимофеев С.В., Назимова Л.Н., Чуканова Л.Н., Новикова Т.В. Сухие латексные иммунодиагностикумы // Матер, науч. конф. посвящ. 85-летию Томск. НИИ вакцин и сывороток НПО "Вирион" (Томск, 1991): Тез. докл. - 1991. - С.55-58.