

Изобретение относится к медицине, касается молекулярной иммунологии и клинико-лабораторных методов исследования.

Известен способ определения специфичности биологической реакции антиген-антитело в сыворотке крови, а именно серологической, например, реакция связывания комплемента (РСК), применяемая для идентификации инфекционных и неинфекционных маркеров. Способ проводится путем соединения исследуемой сыворотки крови с известным диагностикумом. В результате биологической реакции образуется комплекс антиген-антитело, который связывает комплемент. По реакции связывания комплемента судят о специфичности Серологической реакции [Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований. Под ред. проф. В.В. Меньшикова. М. - 1977. - С 121-146].

Следует также отметить, что в серологических исследованиях при определении специфичности биологической реакции антиген-антитело, кроме метода РСК, применяются другие реакции, например, реакция непрямой гемагглютинации (РИГА), реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), реакция преципитации (РП) и др. [Лабораторные методы исследований в клинике: Справочник/Под ред. В.В. Меньшикова. - М.: Медицина. - 1987. - С. 277-306].

Однако известные способы имеют следующие недостатки:

- они многоступенчатые, требуют длительной предварительной подготовки тест-систем: гемолитической системы, подбор рабочих титров комплемента, антигенов, антител, гемолитической сыворотки и пр.;
- не всегда специфичны, что не исключает ложноположительные и ложноотрицательные результаты исследования;
- обладают недостаточной чувствительностью;
- оценка результатов основана на субъективном, визуальном методе учета биологической реакции, например, по наличию или отсутствию агглютинации или преципитации, что часто приводит к ошибке учета из-за появления микропреципитатов, или микроагглютинатов, которые невозможно учесть визуально;
- невозможность визуального учета биологической реакции антиген-антитело в отдельных случаях, например, при определении биологической совместимости белков сыворотки и плазмы крови.

За прототип принят способ определения специфичности биологической реакции в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА). Способ-прототип проводится путем соединения исследуемой сыворотки крови с диагностикумом, который сорбирован на полистироловом носителе, и который выбирается в зависимости от поставленной диагностической задачи. В результате биологической реакции образуется комплекс антиген-антитело, индикация которого проводится при помощи конъюгата и фермент-субстратной смеси, изменение окраски которой учитывается на вертикальном фотометре. Затем, сравнивая оптическую плотность исследуемого образца со стандартными сыворотками (положительными и отрицательными), по известному алгоритму оценивается специфичность биологической реакции антиген-антитело [Теория и практика иммуноферментного анализа/ Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. - М.: Высшая школа -1991. - С.77-146]. Способ-прототип сложен в техническом исполнении, многоступенчат и включает: сорбирование диагностикума, неоднократные промывки полистиролового носителя специальными буферными растворами, сушку полистиролового носителя, приготовление реактивов, соответствующую подготовку исследуемой сыворотки, использование канцерогенных индикаторов (ортофенилендиамин) и пр., после чего становится возможным. учет биологической реакции антиген-антитело.

Кроме того, способ-прототип имеет следующие недостатки:

- он не является достаточно специфичным, что не исключает ложноположительные и ложноотрицательные результаты биологической реакции, которые могут составлять от 10 до 25%;
- для уточнения специфичности биологической реакции в ИФА требуется обязательное дополнительное подтверждающее (верифицирующее) исследование, причем с использованием другой биологической реакции - иммуноблоттинга;
- требует использования сложных и дорогостоящих биотехнологий, а также промывающего устройства и регистрирующей аппаратуры - вертикального фотометра.

В основу изобретения поставлена задача усовершенствования способа определения специфичности биологической реакции антиген-антитело путем выявления денатурированных белков в исследуемой сыворотке крови, соединенной с диагностикумом, по появлению свободных небелковых SH-групп, за счет чего обеспечивается повышение специфичности и чувствительности способа, достигается универсальность в плане определения специфичности биологической реакции разных антигенов с соответствующими им антителами, а также сокращается время на исследование и повышается достоверность результатов.

Поставленная задача решается тем, что в предлагаемом способе определения специфичности биологической реакции антиген-антитело в исследуемой сыворотке крови, соединенной с диагностикумом, согласно изобретению, выявляют денатурированные белки по появлению свободных небелковых SH-групп, наличие которых свидетельствует о специфичности биологической реакции антиген-антитело.

Существующие способы определения специфичности биологической реакции антиген-антитело громоздки, длительны по выполнению, требуют многоступенчатых лабораторных манипуляций.

Кроме того, для проведения способа-прототипа необходима специальная, сложная, высокоточная и дорогостоящая аппаратура [Теория и практика иммуноферментного анализа. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. - М.: Высшая школа - 1991. - С. 77-146].

Заявляемый нами способ обеспечивает повышение специфичности и чувствительности при определении биологической реакции причем разных антигенов с соответствующими им антителами, а также сокращение времени на исследование, повышение достоверности результатов.

Мы исходили из того, что с общепатологической точки зрения специфическое повреждение белковой молекулы - это ее денатурация [Адо А.Д. Вопросы общей нозологии. - М.: Медицина, 1985. - С.7]. Известно, что каждое повреждение начинается с изменения в строении и свойствах разных молекул в клетках и тканях организма [Белицер В.А.//Укр. биохим. журн., 1962. - Т. 24. - В.2. - с.290].

В молекулярном аспекте специфическое повреждение характеризуется нарушением сил сцепления

между полипептидами и нарушением их пространственной конфигурации, т.е. вторичной, третичной и четвертичной структуры белков, упорядоченности из макроструктуры - денатурации [Жоли М. Физическая химия денатурации белков. - М., - 1968. - С. 3-21].

Любая биологическая реакция в случае ее специфичности повреждает белковые молекулы и вызывает их денатурационные превращения, которые по своей выраженности могут быть как в виде незначительных структурных изменений, так и в виде полного изменения расположения пептидных цепей [Гауриовиц Ф. Иммунохимия и биосинтез антител. М. - 1969. - С. 43-77]. В результате денатурации белков повышается реакционная способность их функциональных групп, в том числе и белковых сульфгидрильных групп [Белицер В.А.// Укр.бохим. журн., 1962. - Т.24. В 2. - С.290-320]. Вместе с тем, данных относительно нарушения прочности связи небелковых SH-групп с белком в процессе его денатурации, в литературе мы не обнаружили, как и не обнаружили сведений относительно возможности возникновения этого феномена в процессе биологической реакции антиген-антитело и использования его при определении специфичности указанной реакции.

В этом плане большой интерес представляют данные литературы [Капланский С.Я., Азявич А.В.//Вопр.мед.хим. - 1962., Т.8. - №1. - С. 53-58], согласно которых в сыворотке крови отсутствуют и не определяются свободные небелковые SH-группы. Это объясняется тем, что они находятся не в свободном, а в связанном с белком состоянии, о чем свидетельствуют результаты исследований [Modig H.// J.Biochem. - 1966. -60 - №5. - Р.496]. Автор указывает, что факт образования смешанных комплексов между белками и низкомолекулярными тиолами, например, глутатионом свидетельствует о их важной роли в регуляции структуры белковых молекул, которые могут также выступать в качестве депо низкомолекулярных тиолов.

При разработке предлагаемого способа мы исходили из предположения, согласно которого появление свободных небелковых SH-групп в сыворотке крови возможно в условиях денатурации белковых молекул. Денатурация же белковых молекул указывает на специфичность их повреждения в процессе биологической реакции антиген-антитело. В этом плане есть все основания считать, что при денатурации белков сыворотки крови местом их "полома" могут быть дисульфидные мостики. При повреждении белковых молекул, в результате разрыва смешанных дисульфидных связей между ними и низкомолекулярными тиолами, появляются свободные небелковые SH-группы.

Указанное выше и явилось предпосылкой для изучения молекулярных тиолопривных механизмов денатурации белков в процессе биологической реакции антиген-антитело и разработки предлагаемого нами способа.

Предлагаемый нами способ при обследовании здоровых (доноров) и больных осуществляется следующим образом. У обследуемого, с соблюдением правил асептики, производят забор венозной крови в сухую стерильную пробирку и доставляют в лабораторное отделение. Получают сыворотку крови общепринятым способом. Затем в исследуемую сыворотку крови добавляют необходимый диагностикум в соотношении 10:1 и производят термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C, в течение 10 минут. После этого выявляют денатурированные белки, образующиеся в результате их специфического повреждения в ходе биологической реакции антиген-антитело, о чем судят по появлению свободных небелковых SH-групп в исследуемой биологической смеси, содержание которых определяют методом амперометрического титрования (АМТ) [Заявка на изобретение №96124935, приоритет от 27.12.96], и их появление свидетельствует о специфичности, биологической реакции антиген-антитело, а отсутствие свободных небелковых SH-групп свидетельствует о том, что денатурация белков не произошла и биологическая реакция отрицательная.

Предлагаемый нами способ при исследовании стандартной положительной контрольной сыворотки, содержащей известный антиген (аллерген), соединенной с диагностикумом, содержащим соответствующие антитела, осуществляется следующим образом. В исследуемую стандартную положительную контрольную сыворотку добавляют указанный выше диагностикум в соотношении 10:1 и производят термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C, в течение 10 минут.

После этого выявляют денатурированные белки, образующиеся в результате их специфического повреждения в ходе биологической реакции антиген-антитело, о чем судят по появлению свободных небелковых SH-групп в исследуемой биологической смеси и их появление свидетельствует о специфичности биологической реакции антиген-антитело.

Предлагаемый нами способ при исследовании стандартной положительной контрольной сыворотки, содержащей известный антиген (аллерген), соединенной с диагностикумом, который содержит антитела к другому антигену (аллергену), осуществляется следующим образом. В исследуемую стандартную положительную контрольную сыворотку добавляют указанный выше диагностикум в соотношении 10:1 и производят термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C, в течение 10 минут. После этого выявляют денатурацию белков по появлению в ней свободных небелковых SH-групп, и их отсутствие свидетельствует о том, что денатурация белков не произошла и биологическая реакция отрицательная.

Предлагаемый нами способ при исследовании стандартной отрицательной контрольной сыворотки не содержащей антиген (аллерген), соединенной с диагностикумом, который содержит антитела, осуществляется следующим образом. В исследуемую стандартную отрицательную контрольную сыворотку добавляют, указанный выше диагностикум в соотношении. 10:1 и производят термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C, в течение 10 минут. После этого выявляют денатурацию белков по появлению в ней свободных небелковых SH-групп, и их отсутствие свидетельствует о том, что денатурация белков не произошла и биологическая реакция отрицательная.

Проведено изучение чувствительности и специфичности биологической реакции антиген-антитело при помощи способа-прототипа и заявляемого нами способа, сравнительные результаты которых представлены в таблице.

Как видно из таблицы заявляемый нами способ превосходит по чувствительности и специфичности способ-прототип, причем при постановке биологической реакции с разными антигенами и с

соответствующими им антителами.

Пример 1. У больного Т-на, находящегося на стационарном лечении в инфекционном отделении 411 ОГБ по поводу вирусного гепатита В (желтушная форма), на пятый день болезни, с соблюдением правил асептики, производили забор венозной крови в сухую стерильную пробирку. Получали сыворотку крови общепринятым способом.

К 900 мкл исследуемой сыворотки крови добавляли 100 мкл диагностикума, содержащего антитела к HBs-антигену. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C, в течение 10 минут. После этого в исследуемой биологической смеси выявляли денатурированные белки по появлению в ней свободных небелковых SH-групп, содержание которых составило 52 мкМ/л. Такие данные свидетельствовали о специфичности биологической реакции антиген-антитело и о наличии в сыворотке крови больного HBs-антигена.

При определении способом-прототипом в сыворотке крови этого больного также был обнаружен HBs-антиген.

Пример 2. У этого же больного Т-на, находящегося на стационарном лечении в инфекционном отделении 411 ОГБ по поводу вирусного гепатита В, на тридцатый день болезни, с соблюдением правил асептики, производили повторный забор венозной крови в сухую стерильную пробирку. Получали сыворотку крови общепринятым способом. К 900 мкл исследуемой сыворотки крови добавляли 100 мкл диагностикума, содержащего антитела к HBs-антигену. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C, в течение 10 минут. После этого в исследуемой биологической смеси выявляли денатурированные белки по появлению в ней свободных небелковых SH-групп, содержание которых составило 21 мкМ/л. Такие данные свидетельствовали о специфичности биологической реакции антиген-антитело и о наличии в сыворотке крови больного HBs-антигена.

При определении способом-прототипом в сыворотке крови этого больного HBs-антиген не был обнаружен.

Пример 3. У донора Ф-ва, с соблюдением правил асептики, производили забор венозной крови в сухую стерильную пробирку. Получали сыворотку крови общепринятым способом. К 900 мкл исследуемой сыворотки крови добавляли 100 мкл диагностикума, содержащего антитела к HBs-антигену. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C, в течение 10 минут. После этого в исследуемой биологической смеси не выявлены денатурированные белки, т.к. содержание в ней свободных небелковых SH-групп составило 0 мкМ/л. Такие данные свидетельствовали об отсутствии в сыворотке крови донора HBs-антигена, поэтому биологическая реакция была отрицательной.

При определении способом-прототипом в сыворотке крови этого донора HBs-антиген также не был обнаружен.

Пример 4. У донора И-ко, с соблюдением правил асептики, производили забор венозной крови в сухую стерильную пробирку. Получали сыворотку крови общепринятым способом. К 900 мкл исследуемой сыворотки крови добавляли 100 мкл диагностикума, содержащего антитела к HBs-антигену. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C в течение 10 минут. После этого в исследуемой биологической смеси выявляли денатурированные белки по появлению в ней свободных небелковых SH-групп, содержание которых составило 25 мкМ/л. Такие данные свидетельствовали о специфичности биологической реакции антиген-антитело и о наличии в сыворотке крови донора HBs-антигена.

При определении способом-прототипом в сыворотке крови этого донора HBs-антиген не был обнаружен.

Пример 5.

У донора Г-ко, с соблюдением правил асептики, производили забор венозной крови в сухую стерильную пробирку. Получали сыворотку крови общепринятым способом. К 900 мкл исследуемой сыворотки крови добавляли 100 мкл диагностикума моноспецифической сыворотки против иммуноглобулина М. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C, в течение 10 минут. После этого в исследуемой биологической смеси выявляли денатурированные белки по появлению в ней свободных небелковых SH-групп, содержание которых составило 17 мкМ/л. Такие данные свидетельствовали о специфичности биологической реакции антиген-антитело и о наличии в сыворотке крови донора иммуноглобулина М.

При определении способом-прототипом в сыворотке крови этого донора был обнаружен иммуноглобулин М.

Пример 6. У донора Г-ева, с соблюдением правил асептики, производили забор венозной крови в сухую стерильную пробирку. Получали сыворотку крови общепринятым способом. К 900 мкл исследуемой сыворотки крови добавляли 100 мкл диагностикума - моноспецифической сыворотки против иммуноглобулина G. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C, в течение 10 минут. После этого в исследуемой биологической смеси выявляли денатурированные белки по появлению в ней свободных небелковых SH-групп, содержание которых составило 21 мкМ/л. Такие данные свидетельствовали о специфичности биологической реакции антиген-антитело и о наличии в сыворотке крови донора иммуноглобулина G.

При определении способом-прототипом в сыворотке крови этого донора был обнаружен иммуноглобулин G.

Пример 7. У донора К-ва, с соблюдением правил асептики, производили забор венозной крови в сухую стерильную пробирку. Получали сыворотку крови общепринятым способом. К 900 мкл исследуемой сыворотки крови добавляли 100 мкл диагностикума - моноспецифической сыворотки против иммуноглобулина А. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C в течение 10 минут. После этого в исследуемой биологической смеси выявляли денатурированные белки по появлению в ней свободных небелковых SH-групп, содержание которых составило 14 мкМ/л. Такие данные свидетельствовали о специфичности биологической реакции антиген-антитело и о наличии в сыворотке крови

донора иммуноглобулина А.

При определении способом-прототипом в сыворотке крови этого донора был обнаружен иммуноглобулин А.

Пример 8. В сухую стерильную пробирку отбирали 900 мкл стандартной положительной контрольной сыворотки, содержащей орнитозные антитела. Затем к ней добавляли 100 мкл диагностикума, содержащего орнитозный антиген. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C в течение 10 минут. После этого в исследуемой биологической смеси выявляли денатурированные белки по появлению в ней свободных небелковых SH-групп, содержание которых составило 24 мкМ/л. Такие данные свидетельствовали о специфичности биологической реакции антиген-антитело и о наличии в стандартной положительной контрольной сыворотке антител к орнитозу.

Пример 9. В сухую стерильную пробирку отбирали 900 мкл стандартной отрицательной контрольной сыворотки, не содержащей антител к орнитозу. Затем к ней добавляли 100 мкл диагностикума, содержащего орнитозный антиген. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C в течение 10 минут. После этого в исследуемой биологической смеси не выявлены денатурированные белки, т.к. содержание в ней свободных небелковых SH-групп составило 0 мкМ/л. Такие данные свидетельствовали об отсутствии в указанной стандартной отрицательной сыворотке орнитозных антител, поэтому биологическая реакция была отрицательной.

Пример 10. В сухую стерильную пробирку отбирали 900 мкл стандартной положительной контрольной сыворотки, содержащей антитела к орнитозу. Затем к ней добавляли 100 мкл диагностикума, содержащего токсоплазменный антиген. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C в течение 10 минут. После этого в исследуемой биологической смеси не выявлены денатурированные белки, т.к. содержание в ней свободных небелковых SH-групп составило 0 мкМ/л. Такие данные свидетельствуют об отсутствии в указанной стандартной сыворотке токсоплазменных антител, поэтому биологическая реакция была отрицательной.

Таким образом, установлена четкая связь между специфичностью биологической реакции антиген-антитело и устойчивостью белков исследуемой сыворотки крови к воздействию диагностикума при их соединении.

Полученные данные свидетельствуют о том, что заявляемый нами способ по сравнению со способом-прототипом, позволяет одноэтапно оценить специфичность биологических реакций разных антигенов с соответствующими им антителами. Кроме того, он является более чувствительным, простым в исполнении, значительно сокращает время на проведение исследования, не требует дорогостоящих тест-систем и специального оборудования.

Сравнительная оценка чувствительности и специфичности биологической реакции антиген-антитело, определяемой способом-прототипом и предлагаемым способом.

Компоненты биологической реакции		Число обследованных	Обнаружено специфических реакций. абс (%)	
Исследуемый биоматериал – сыворотка крови	Диагностикум		Способ-прототип	Предлагаемый способ
доноров	Орнитозный антиген	52	8 (15,4%)	27 (51,9%)
доноров	Токсоплазменный	52	21 (40,3%)	33 (63,5%)
доноров	антитела к HBs-антигену	52	16 (100%)	25 (48,2%)
доноров	MCC Ig M	52	52 (100%)	52 (100%)
доноров	MCC Ig G	52	52 (100%)	52 (100%)
доноров	MCC Ig A	52	52 (100%)	52 (100%)
больных ВГВ (1–10 день заболевания)	антитела к HBs-антигену	121	121 (100%)	121 (100%)
больных ВГВ (30–60 день заболевания)	антитела к HBs-антигену	81	33 (40,7%)	81 (100%)
больных с синдромом Рейтера	Орнитозный антиген	77	51 (66,2%)	75 (97,4%)
больных с инфекционно-аллергическим полиартритом	Орнитозный антиген	34	13 (38,2%)	29 (85,3%)

П р и м е ч а н и е: MCC Ig M, Ig G, Ig A – моноспецифическая сыворотка против иммуноглобулинов соответственно M, G, A;
ВГВ – вирусный гепатит В