

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ С ПОМОЩЬЮ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ ЛАТЕКСА

Нарушения обмена иммуноглобулинов с возникновением гипо- или гипергаммаглобулинемии возможны при некоторых соматических и инфекционных заболеваниях, таких как хронический лимфолейкоз, синдром Вискотта-Олдрича, атаксия, криоглобулинемия, нефротический синдром, желудочно-кишечные заболевания, заболевания соединительной ткани, вирусный гепатит, циррозы, миеломы, макроглобулинемии Вальденстрема, доброкачественные гаммапатии и др. [4, 5].

В клинической практике для определения иммуноглобулинов классов G, A и M обычно используется общеизвестный метод Манчини, отличающийся многоэтапностью, сложностью постановки, длительностью анализа.

Целью нашей работы стало использование для определения количества иммуноглобулинов классов G, A и M специфических латексных диагностикумов в реакции агглютинации латекса (РАЛ). Данный метод позволяет снизить трудоемкость исследования и сократить рабочее время для проведения анализов.

РАЛ—портативная, доступная в исполнении и легко читаемая реакция. Она удобна для использования в амбулаторных условиях и позволяет получать стабильные, хорошо воспроизводимые результаты определения различных биохимических критериев, дающие возможность не только прогнозировать заболевание, но и корректировать схему индивидуального лечения [8]. РАЛ давно и с успехом используется для качественных проб [1—3], в количественном анализе она применялась в сочетании с приборами, измеряющими плотность латексных взвесей или количество агглютинированных частиц. Таким образом, агглютинацию измеряли с помощью спектрофотометра [9], нефелометра [10], сканирующей лазерной микроскопии [12], угловой анизотропии [6, 7, 13], флюоресценции [11]. Сложная измерительная аппаратура не всегда доступна для клинических лабораторий, поэтому мы предложили метод титрования исследуемой сыворотки. Так как при оценке гуморального иммунитета вполне достаточным является выяснение степени отклонения иммуноглобулинов от нормального значения, а не их точного количества, определение титра исследуемых антител в РАЛ имеет большую информативную ценность. При этом не требуется дополнительного оборудования для постановки и учета результатов реакции, возможно многократное использование иммунологических планшетов.

Таблица

Соответствие концентрации иммуноглобулинов, определенных в РАЛ и по способу Манчини

<i>IgG</i>		<i>IgA</i>		<i>IgM</i>	
титр в РАЛ	мг/мл	титр в РАЛ	мг/мл	титр в РАЛ	мг/мл
1 : 6400 – 1 : 12800	0,6-10,0	1: 1600 – 1: 3200	1,5-2,0	1: 200 – 1: 1600	1,0-1,5
1: 12800 – 1: 25600	10,0-15,0	1: 3200 – 1: 12800	2,0-3,0	1: 1600 – 1: 3200	1,5-2,0
1: 25600 – 1: 102400	15,0-20,0	1: 6400 – 1: 25600	3,0-4,0	1: 3200 – 1: 12800	2,0-2,5
1: 51200 – 1: 204800	20,0-30,0	1: 25600 – 1: 51200	4,0-5,0	1: 6400 – 1: 25600	2,5-3,5
1: 409600 и более	>30,0	1: 102400 и более	>5,0	1: 51200 и более	>3,5

Материалы и методы. Для получения специфических латексных диагностикумов использовали в качестве носителя латекс АКРОЛАР-к (ТУ-6-09-10-1824-88), окрашенный пиронином в розовый цвет, с размером частиц 1,8 мкм (производство Института биоорганической химии, Москва).

Специфические глобулиновые фракции для сенсибилизации латекса получали из антисывороток к тяжелым цепям иммуноглобулинов классов G (н), A (н) и M (н) (производство Медико-биологической корпорации, ТУ 42; Нижний Новгород), выявляющие иммуноглобулины только соответствующего класса.

Гаммаглобулиновую фракцию из моносывороток выделяли путем высаливания сульфатом аммония с последующей отмывкой белка диализом против воды и фосфатного буфера (рН 7,6-7,8). Концентрация сенсибилизирующих антител для активации латекса составляла 70-100 мкг/мл. После отмывки, латексные препараты нейтрализовали 1% раствором, глицина. Контрольный препарат представлял собой латекс, функциональные группы которого были блокированы глицином.

Латексные препараты стабилизировали путем лиофильного высушивания в защитной среде, содержащей 7% сахарозы и 2% бычьего сывороточного альбумина.

Для проведения РАЛ использовали планшеты для иммунологических реакций (ТУ-64-2-278-79) с U -образным дном.

Жидкость для разведения сывороток представляла собой 0,01 М фосфатный буфер с рН 7,4-7,6. Титрование сывороток проводили двукратным способом в объеме 25 мкл. Диагностикумы добавляли к каждому разведению сыворотки в объеме 25 мкл.

Результаты реакции оценивали по 4-крестовой системе через 3 ч после ее постановки.

Результаты и обсуждение. Для исследования возможности выявления иммуноглобулинов классов G, A и M в сыворотке крови человека был проведен анализ 50 сывороток параллельно двумя методами: с помощью РАЛ и способа Манчини.

Специфичность латексных диагностикумов соответствовала уровню специфичности, характерному для метода Манчини, так как исходным материалом для специфических лигандов при сенсибилизации латекса были антисыворотки, используемые в реакции Манчини. При постановке РАЛ на агглютинацию латекса влияет структура измеряемых иммуноглобулинов, что делает необходимым использование латексной взвеси в разной концентрации. Так, выявление IgM (пентамера) возможно при использовании 0,2% взвеси специфического диагностикума. Для определения IgG и IgA необходимо увеличить концентрацию латексных частиц до 0,4%, чтобы обеспечить агглютинацию частиц при формировании характерной "сетки" из частиц латекса.

По-видимому, конструкция IgG (мономера) и IgA (димера) требует более близкого расположения частиц друг к другу ввиду малых размеров иммуноглобулинов.

Как видно, РАЛ выявляет иммуноглобулины классов G, A и M в границах, соответствующих значениям, используемым в клинической практике для оценки изменений их количества.

Преимуществом РАЛ в данном случае является экспрессное определение значительных отклонений концентраций иммуноглобулинов от средней нормы, что имеет важное клиническое значение.

Выводы. 1. Получены специфические латексные диагностикумы против иммуноглобулинов классов G, A и M.

2. Выявлено соответствие получаемых результатов определения количества иммуноглобулинов способом Манчини и в РАЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Александр С.К., Лукин Ю.В. и др. // Актуальные проблемы диагностики и профилактики кори, эпидемического паротита и краснухи: Тезисы науч. конф.-М., 1992.- С.28*
2. *Асеева В.Г., Падыков Л.Н. // Журн. микробиол.- 1994.-№1.-С.107-113*
3. *Горбачев Е.Н., Лукин Ю.В. // Актуальные вопросы медицинской биотехнологии. - Томск, 1991.-С.151-152.*
4. *Казанцев А. Н., Попова Н. И. // Внутриутробные инфекционные заболевания детей и их профилактика.- М., 1980. - С. 227*
5. *Лукин Ю. В., Трифионов В. Л., Туркин. С. И., Зубов В. П. // Труды МХТИ.- 1985, - Вып. 135. - С. 88-92.*

6. *Матвеев А. Г., Мешандин А. Г.* // Всероссийский съезд эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, 6-й: Тезисы докл.- М., 1991. –Т.2. - С.226.
7. *Gray J.J. et al.* // *J. virol. Meth.* - 1987. - Vol. 16. -P. 13-19.
8. *Hudfield S. G. et al.* // *J. clin. Microbiol.* 1987. - Vol. 22, N 7.-P.1121-1124
9. *Halstead D. C. et al.* // *Ibid.* - P. 936-937.
10. *Heikkila R. e.t-al.* // *Ibid.* - P. 1131-1133.
11. *Holmberg H. et al.* // *J. clin. Microbiol.* — 1985. - Vol. 21, N5-P. 745-748.
12. *Hoopwood V. et al.* // *Eun J. clin. Microbiol.* - 1987. -Vol. 6, N 4. - P. 392-394.
13. *Leinonen M., Sivonen A.* // *J. clin. Microbiol.* — 1979. — Vol. 10. — P. 404.
14. *Mathewson J. J. et al.* // *Diagn. Microbiol. infect. Dis.* — 1989. - Vol. 12, N 2. — P. 139-141.

Опубликовано: *Ж. «Клиническая лабораторная диагностика».*-2000.-№5.- С.23-24,33