

МЕТОД ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА М

Для лабораторно-диагностической практики большое значение имеют простые и доступные методы исследования, дающие достоверные данные и не требующие сложной аппаратуры для чтения результатов в реакции. В связи с этим все шире используется реакция агглютинации латекса (РАЛ). Работы в этом направлении ведутся как в отечественных лабораториях; так и за рубежом [1, 3, 4, 7]. Объектами исследования могут быть кровь, моча, фекалии, спинномозговая жидкость, мазки из носоглотки, рта, влагалища, содержимое везикул, мокрота, изоляты бактерий, бульонная культура клеток [3]. С помощью специфических маркеров на латексе можно выявлять пневмококки [7], менингококки [8], водорастворимые антигены слизи *Pseudomonas aeruginosa* [2], капсульные антигены *H. influenzae* [10], стрептококки группы А [12], *Candida albicans* [11], цитометаловирусы [13], вирус простого герпеса [9], ВИЧ [15], ротавирусы [14], а также антитела к вирусу кори [1], возбудителя дизентерии Зонне [4], антигенов чумы, туляремии, гепатита, хорионического гонадотропина человека [7].

Цель нашей работы - изучение возможности определения с помощью РАЛ одного из показателей гуморального иммунитета человека — иммуноглобулина класса М (IgM). Отклонение от нормального содержания IgM в сыворотке крови может свидетельствовать о неблагополучии в состоянии здоровья. Антитела класса М в первую очередь вырабатываются в ответ на инфекцию организма, антигенное раздражение при аутоиммунных реакциях и вакцинацию. Данные о содержании IgM в динамике важны для установления диагноза, прогноза лечения, контроля эффективности проводимых лечебных мероприятий. Количество естественно содержащегося IgM необходимо знать перед проведением вакцинации детей и взрослых. Анализ сыворотки крови новорожденных на содержание IgM дает возможность исключить внутриутробную инфекцию.

Как известно, количество иммуноглобулинов в сыворотке крови определяется до сих пор в лабораторной практике методом Манчини. Многоэтапность этого метода и определенная сложность в постановке препятствуют его широкому распространению, а также исключают проведение срочных анализов ввиду длительности реакции.

Мы предлагаем использовать для количественного определения IgM специфический латексный диагностикум. Целесообразность его использования основана на определенных преимуществах РАЛ по сравнению со способом Манчини, а также с чувствительным иммуноферментным анализом (ИФА).

В первом случае РАЛ отличается от постановки реакции по Манчини скоростью проведения анализа. Для постановки РАЛ требуется всего 3—3,5 ч, в то время как по способу Манчини результаты реакции читаются через 48 ч. К тому же чувствительность РАЛ в 100 000 раз превышает чувствительность реакций Манчини.

От ИФА РАЛ выгодно отличается одноэтапностью постановки и простотой выполнения. Для РАЛ не требуется дополнительного оборудования при чтении результатов реакции, к тому же возможно многократное использование иммунологических планшет. По чувствительности РАЛ почти приближается к ИФА: с помощью предлагаемого метода выявляется до 20 -15 нг/мл исследуемого белка.

Материалы и методы. При получении специфического латексного диагностикума для выявления IgM в качестве носителя был использован латекс АКРОЛАР-к (ТУ-6-09-10-1824—88), окрашенный пиронином в розовый цвет, с размеров частиц 1,8 нм

(производство Института биоорганической химии, Москва). На поверхности сферических частиц латекса находятся активные альдегидные группы, способные вступать в химическую связь с аминокруппами белков, образуя основание Шиффа. Частицы латекса между собой не агглютинируются, так как в составе носителя имеются ионные и неионные детергенты [6].

Сенсибилизацию частиц латекса проводили специфическими антителами против IgM, полученными в соответствии с ВФС 4 -304. Концентрация антител для сенсибилизирующего раствора составляла 10 мкг/мл. Сенсибилизированный латекс отмывали 0,01 М фосфатным буфером (рН 7,4—7,6), оставшиеся свободные альдегидные группы блокировали 1% раствором глицина в фосфатном буфере.

Контрольный препарат латекса получали, инкубируя латексные частицы только с раствором глицина.

Готовые латексные препараты были лиофильно высушены в стабилизирующем растворе (7% водный раствор сахарозы). В качестве консерванта добавляли тиомерсал натрия в концентрации 0,01%.

Постановку РАЛ проводили в планшетах для иммунологических реакций (ТУ-64-2-278—79) с U-образным дном. В качестве разводящей жидкости для диагностикумов и сывороток использовали 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,4-7,6). Сыворотки двукратно разводили в объеме 25 мкл.

К каждому разведению сыворотки добавляли 25 мкл специфического диагностикума. Параллельно первое разведение сыворотки смешивали с 25 мкл контрольного препарата латекса.

Интенсивность реакции оценивали в крестах: ++++ — "зонтик" по всей поверхности лунки; +++ — "зонтик" на 3/4 лунки; ++ — "зонтик" на 1/4 лунки; + — рыхлый осадок на дне лунки; отрицательная реакция — четкая точка с гладкими краями на дне лунки.

Таблица

Чувствительность латексного диагностикума для выявления IgM

№ образца сыворотки	Концентрация IgM, определенная по способу Манчини, мг/мл	Титр сыворотки в РАЛ	Чувствительность, мг/мл
1	0,52	1/32 000	16
2	1,0	1/64 000	15
3	1,8	1/64 000	28
4	3,0	1/128 000	23
5	5,6	1/256 000	21

Результаты и обсуждение. Для характеристики полученного диагностикума были выявлены его чувствительность и специфичность. ,

Чувствительность диагностикума определяли в РАЛ с сывороткой крови взрослых с содержанием IgM, установленным способом Манчини (в мг/мл). Полученные данные представлены в табл. 1.

Чувствительность (Ч) определяли по формуле:

$$Ч \text{ нг/мл} = \frac{С \text{ нг/мл}}{Т}$$

где С - концентрация IgM по Манчини (в нг/мл), Т - титр сыворотки в РАЛ.

Показано, что чувствительность полученного латексного диагностикума в среднем составляет $20,6 \pm 4,08$ нг/мл.

Специфичность диагностикума определяли в реакции торможения. Для нейтрализации IgM в исследуемой сыворотке использовали антииммуноглобулиновые моноспецифические сыворотки против IgM и IgG из набора для реакции Манчини (производство НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава РФ, Нижний Новгород).

В одном случае в жидкость для разведения была добавлена антисыворотка против IgM в разведении 1/2000 (I), в другом — антисыворотка против IgG в разведении 1/2000 (II), в третьем — жидкость для разведения использовалась без изменений (III). Сыворотку крови одного лица раститровывали в каждой жидкости от 1/2000 до 1/128 000. К каждому разведению во всех трех вариантах добавляли латексный диагностикум. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Специфичность латексного диагностикума для IgM

Титр исследованной сыворотки	Жидкость для разведения		
	I	II	III
1/2000	+++	++++	++++
1/4000	+++	++++	++++
1/8000	++	++++	++++
1/16000	—	++++	++++
1/32000	—	+++	+++
1/64000	—	++	++
1/128000	—	+	+

Из табл. 2 видно, что при использовании антисыворотки против IgM (жидкость для разведения I) РАЛ тормозится на 4 разведения сыворотки. Это не наблюдается, если в жидкость для разведения была добавлена антисыворотка против IgG (II) или эта жидкость была оставлена без изменения (III).

Таким образом, в результате проведенного исследования показана достаточная чувствительность и специфичность предлагаемого латексного диагностикума в РАЛ.

Таблица 3

Содержание IgM в сыворотках взрослых

№ образца сыворотки	Титр в РАЛ	IgM, мг/мл (способ Манчини)	№ образца сыворотки	Титр в РАЛ	IgM, мг/мл (способ Манчини)
1	1/8000	0,68	11	1/64000	1,0
2	1/16000	0,90	12	1/64000	1,7
3	1/16000	1,0	13	1/64000	1,9
4	1/32000	1,5	14	1/64000	2,0
5	1/32000	1,5	15	1/64000	1,0
6	1/32000	1,4	16	1/64000	1,8
7	1/32000	1,8	17	1/64000	2,0
8	1/32000	1,3	18	1/128000	3,3
9	1/32000	1,5	19	1/128000	3,0
10	1/32000	1,4	20	1/256000	5,0

Определяя пригодность полученного диагностикума для серологических исследований содержания IgM в крови, проанализировали две группы сывороток: I - сыворотки взрослых; II - сыворотки новорожденных. Параллельно концентрацию IgM в этих сыворотках определяли по способу Манчини. Результаты анализа приведены в табл. 3 и 4.

Как видно из табл. 3, IgM в сыворотках взрослых выявляется до титра 1/256 000. Наблюдается соответствие данных РАЛ и результатов реакции Манчини. С увеличением концентрации IgM увеличивается и разведение сыворотки, при котором наблюдается агглютинация частиц латекса.

Известно, что плацента матери не пропускает в организм плода с током крови IgM ввиду большого размера молекулы IgM [5]. Появление определенного количества IgM в крови новорожденного может свидетельствовать как о небольшом антигенном раздражении иммунной системы плода (содержание IgM 0,5—0,6 мг/мл), так и о внутриутробном инфицировании (содержание IgM 1,2—2,0 мг/мл).

Таблица 4

Содержание IgM в сыворотках крови новорожденных

№ образца сыворотки	Титр в РАЛ	IgM, мг/мл (способ Манчини)	№ образца сыворотки	Титр в РАЛ	IgM, мг/мл (способ Манчини)
1	1/400	-	11	1/600	0,2
2	1/800	-	12	1/600	следы
3	1/800	-	13	1/600	”
4	1/800	-	14	1/3200	0,32
5	1/800	-	15	1/3200	0,35
6	1/1600	0,27	16	1/3200	0,34
7	1/1600	следы	17	1/6400	0,25
8	1/1600	”	18	1/12800	0,46
9	1/1600	”	19	1/12800	0,45
10	1/1600	-	20	1/64000	2,0

Примечание. Прочерк — отсутствует.

Из табл. 4 следует, что IgM практически отсутствует в пуповинной сыворотке крови. С помощью РАЛ IgM у здоровых новорожденных выявляется в титре не выше 1/12 800. Исключение представляет собой образец сыворотки № 20, в котором IgM обнаружен в титре 1/64 000. Высокое содержание IgM в данном случае подтверждается при исследовании сыворотки по способу Манчини (2Д мг/мл). Появление IgM в такой концентрации в сыворотке крови новорожденного говорит или о нарушении проницаемости плаценты матери, или о внутриутробном инфицировании.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что метод Манчини не позволяет определить содержание IgM ниже чем 0,2 мг/мл, в то время как с помощью РАЛ можно определить IgM и в меньших количествах. Метод РАЛ сокращает сроки анализа и дает результаты, сопоставимые с данными реакции Манчини.

Таким образом, в результате проведенной работы показано, что для определения содержания IgM в сыворотке крови людей различного возраста и состояния здоровья РАЛ вполне пригодна и информативна. Предлагаемый тест прост в исполнении, доступен для любой лаборатории, позволяет исследовать сыворотку крови на IgM в динамике ех tempore, может быть использован для исключения у новорожденных внутриутробной инфекции.

Выводы. 1. Получен специфический латексный диагностикум для определения концентрации IgM в сыворотке крови человека с чувствительностью $20,6 \pm 4,08$ нг/мл.

2. Показана эффективность использования латексного диагностикума при иммунологическом анализе крови новорожденных и взрослых.

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. Александрова И. А. и др. // Журн. микробиол. — 1986. — № 4. - С. 10-14.
3. Асеева В. Г., Палюков Л. Н. // Там же. — 1994. — № 1. — С. 107-113
4. Горбачев Е.Н., Лукин Ю. В. //Актуальные вопросы медицинской биотехнологии, — Томск, 1991. — С. 151 — 152.
5. Казанцев А. Н., Попова Н. И. // Внутриутробные инфекционные заболевания детей и их профилактика. — М., 1980. -С. 227.
6. Лукин Ю, В., Трифонов В. Л., Туркин. С. И., Зубов В. П. //Труды МХТИ.— М., 1985, - Вып. 135. - С. 88-92.
7. Матвеев А. Г., Мешандин А. Г.// Всероссийский съезд эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, 6-й: Тезисы докл.-- М., 1991. -Т: 2. - С. 226.
8. Ggay J.J.et al. // J. yirol. Meth. - 1987. - Vol. 16. -P. 13-19.
9. Hudfield S. G. et al. // J. clin. Microbiol.— 1987. - Vol. 22, N 7
10. Halstead D. C. et al. // Ibid. - P. 936-937.
11. Heikkila R. et-al. // Ibid. - P. 1131-1133.
12. Helmberg H., et al. // J. clin. Microbiol. — 1985. - Vol. 21. -P. 745-748.
13. Hoopwood V. -et al. // Eun J. clin. Microbiol. - 1987.-Vol. 6, N 4. - P. 392-394.
14. Leinonen M., Sivonen A. // J. clin. Microbiol. — 1979. — Vol. 10. — P. 404.
15. 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.44-46