

УДК 541.64:678.4:678.7

Р.О. Петріна, Є.М. Кісельов, Л.І. Лонич*

Національний університет "Львівська політехніка",
кафедра технології біологічно-активних сполук, напівпродуктів та барвників

*Львівський НДІ епідеміології та гігієни

ПОЛІМЕРНІ НОСІЇ ДЛЯ ІМУНОДІАГНОСТИКИ

© Петріна Р.О., Кісельов Є.М., Лонич Л.І., 2000

Отримано монодисперсні мікросфери для іммобілізації біоактивних лігандів. Описано технологію отримання діагностичних препаратів на основі реакції аглютинації латекса для виявлення дифтерії.

Monodisperse microspheres for the immobilization of bioactive ligands are synthesised. The technology of obtaining of diagnostic preparates on the base of the reaction of latex agglutination for the diphteria determination is described.

З метою вдосконалення серологічної експрес-діагностики ряду інфекційних захворювань (дифтерія та правець) було розроблено технологічні принципи конструювання готових до використання антигенних діагностичних препаратів на основі полістирольних мікросфер-латексів.

Було розроблено нову технологію формування полістирольних композитних частинок, нову схему модифікації їх поверхні різними функціональними групами [1, 2]. Характерною особливістю синтезованих латексів є висока сорбційна здатність по відношенню до біологічно-активних речовин і гладка поверхня, що підвищує їх доступність для взаємодії із збудником, який знаходиться в біологічних рідинах хворого, або з захисними білками, які виробляє організм у відповідь на інфекцію.

На основі отриманих даних [1] були визначені оптимальні температура і вихідна концентрація мономеру та ініціатора для отримання монодисперсних латексів з розміром частинок 0,5–1,2 мкм ($T=353\text{K}$, $C_M=1,089$ моль/л, $C_I=24,8 \cdot 10^{-3}$ моль/л) (рис. 1).

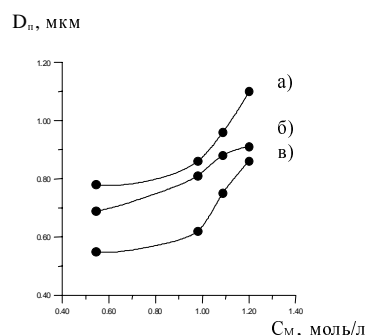
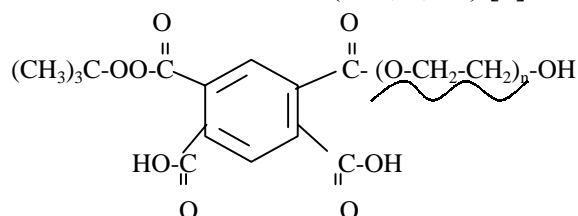


Рис.1. Залежність середнього діаметра частинок латексу від початкової концентрації мономеру при C_i ($K_2S_2O_8$):

а) $20,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л; б) $22,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л;
в) $24,8 \cdot 10^{-3}$ моль/л

Модифікація монодисперсного латексу адсорбцією реакційноздатних ПАР проводилась у водному середовищі. Як поверхнево-активні модифікатори використано олігомерні перефіри з різною довжиною ланцюга ($n=3, 9, 12$) [2]:



Вказані процеси вивчені вперше, на їх основі створено вперше модифіковані частинки, що містять реакційноздатні групи для іммобілізації біоспецифічного ліганду.

Визначення розмірів частинок отриманих латексів проводили за допомогою електронної мікроскопії. Розміри частинок цієї серії дорівнюють 0,5–1,5 мкм.

Модифіковані мікросфери мають добру стабільність при зміні температури, центрифугуванні, тривалому зберіганні, характеризуються вузьким РЧР і задовольняють вимоги, які необхідні для використання їх в імунодіагностиці. Сорбенти покриті різними іонними комбінаціями, які визначають їх гідрофобність та заряд.

Вивчалась адсорбція дифтерійного та правцевого анатоксину на поверхні латексних частинок трьох типів: ПС – стирольних частинок з сульфатними групами на поверхні, ПС-ПМ – стирольних частинок з карбоксильними групами та перефірними групами на поверхні, ПС-ОП – стирольних частинок з ПАР на поверхні частинок.

Таблиця 1

Визначення сорбційної ємності латексних частинок

| Показники | Тип латексного носія | | | | |
|---|----------------------|--------|-------|--------|--------|
| | ПС1 | ПС2 | ПС-ПМ | ПС-ОП3 | ПС-ОП9 |
| Чутливість в модельному тесті, МО/мл | 0,006 | 0,0008 | 0,003 | 0,0004 | 0,003 |
| К-сть білка в розчині антигена після сенсibiliзації, г/мл | 0,80 | 0,90 | 0,55 | 0,85 | 0,50 |
| Сорбційна ємність білка, що приєднався, % | 20 | 10 | 45 | 15 | 50 |

Таблиця 2

Активність дифтерійного латексного діагностикуму з різними концентраціями анитоксину в РАЛ із дифтерійною стандартною сироваткою

| Латекс | Концентрація ДАТ у вихідному розчині, мкг/мл | Концентрація ДАТ у розчині після сенсibiliзації, мкг/мл | Адсорбція ДАТ на латексі, % | Активність ДЛП в РАЛ, МО/мл |
|---------|--|---|-----------------------------|-----------------------------|
| ПС-ОП12 | 100 | 72 | 28 | 0,025 |
| | 300 | 180 | 40 | 0,0125 |
| | 500 | 270 | 46 | 0,006 |
| | 1000 | 590 | 41 | 0,0125 |
| ПС-ОП3 | 100 | 61 | 39 | 0,0125 |
| | 300 | 150 | 50 | 0,006 |
| | 500 | 215 | 57 | 0,003 |
| | 1000 | 480 | 52 | 0,006 |
| ПС | 100 | 60 | 40 | - |
| | 300 | 141 | 53 | 0,003 |
| | 500 | 200 | 60 | 0,0015 |
| | 1000 | 460 | 54 | 0,003 |
| ПС-ПМ | 100 | 56 | 44 | - |
| | 300 | 132 | 56 | 0,003 |
| | 500 | 175 | 65 | 0,0015 |
| | 1000 | 450 | 55 | - |
| ПС-ОП9 | 100 | 49 | 51 | 0,0125 |
| | 300 | 114 | 62 | 0,003 |
| | 500 | 150 | 70 | 0,0008 |
| | 1000 | 350 | 65 | 0,003 |

Опрацьовано оптимальні умови сенсibilізації частинок латексу БСА (оптимальними є $T\ 37^{\circ}C$, $pH\ 8,2$ в гліциновому буфері, час – 2–3 год), визначена сорбційна ємність латексних частинок (табл.1), оптимальні умови постановок РАЛ із створеними діагностичними препаратами (це є відношення 1:4, тобто 80 мкл сироватки з активністю 0,1 МО/мл і 20 мкл ЛД 1,5 %). Визначено вплив концентрації анатоксину на активність латексних препаратів (найбільша активність спостерігається для концентрації 500 мкг/мл для дифтерійного та правцевого анатоксину (табл.2)).

РАЛ набагато чутливіший та специфічніший метод, ніж РПГА, і разом з тим, ці показники максимально наближаються до результатів дослідного клініко-рентгенологічного обстеження: % співпадіння досягає 94 %, а чутливість і специфічність відповідно 95 % та 92 %, що є високим показником для серологічних тестів.

Отже, все вищесказане дає змогу зробити висновок, що створена діагностична тест-система є високочутливою та специфічною для виявлення дифтерії. Для підтвердження цього висновку проводили додатковий аналіз одержаних результатів – залежність результатів РАЛ від віку (рис. 2) і статі (рис. 3) обстежених.

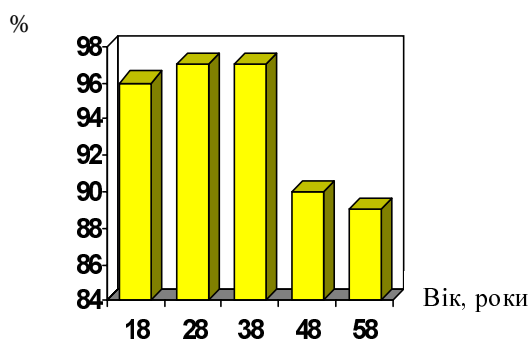


Рис. 2. Частота позитивних реакцій в РАЛ в різних вікових групах у хворих на дифтерію

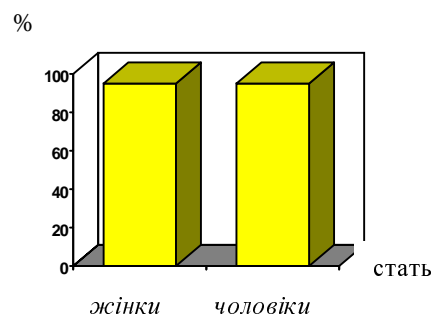


Рис. 3 Частота позитивних реакцій в РАЛ залежно від статі хворих на дифтерію

Проведений аналіз результатів РАЛ залежно від статі хворих свідчить, що частота позитивних реакцій була майже однаковою у жінок (95,2 %) і чоловіків (94,3 %), які хворіли на дифтерію (рис. 3).

Залежність результатів РАЛ від віку хворих на дифтерію показано на рис. 2. Із цієї діаграми видно, що відсоток підтвердження діагнозу в РАЛ майже однаковий в усіх вікових групах. Проте необхідно відзначити, що у хворих на дифтерію старших 58 років відсоток позитивних реакцій в РАЛ дещо нижчий, ніж у молодих пацієнтів, але ця різниця виявилася дуже незначною. Тобто доведено, що РАЛ є важливим діагностичним критерієм у різних вікових групах хворих на дифтерію.

Таким чином, створена нова тест-система для експрес-діагностики дифтерії на основі РАЛ має високу діагностичну ефективність. Нова тест-система дає можливість в максимально короткі терміни з високою чутливістю та специфічністю діагностувати дифтерію незалежно від віку та статі хворого.

1. Петріна Р.О., Кісельов Є.М., Зарічна О.З., Новіков В.П. Полімерні мікросфери для ковалентного зв'язування біоспецифічних лігандів // Вісн. ДУ "Львівська політехніка". 1999. № 374. С.70–73. 2. Петріна Р.О., Кісельов Є.М., Новіков В.П., Гаргай Х.І. Створення монодисперсних полімерних мікросфер, сучасні можливості макромолекулярного дизайну на їх основі // Наук. записки Терноп. ДПУ. Серія: Хімія. 1999. Вип.4. С.45–49.